

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003年6月5日 (05.06.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/046186 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/67, C12Q 1/68, C12N 5/00, A61K 45/00, 48/00, A01K 67/027

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/12447

(22) 国際出願日: 2002年11月28日 (28.11.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2001-363385
2001年11月28日 (28.11.2001) JP
PCT/JP02-11293
2002年10月30日 (30.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社先端科学技術インキュベーションセンター (CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号新丸ノ内ビルディング6階 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 多比良 和誠

(TAIRA, Kazunari) [JP/JP]; 〒305-0046 茨城県つくば市東2丁目4番29号 Ibaraki (JP). 宮岸 真 (MIYAGISHI, Makoto) [JP/JP]; 〒270-1166 千葉県我孫子市我孫子121-1 スカイヒルズ我孫子503号室 Chiba (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特

[続葉有]

(54) Title: siRNA EXPRESSION SYSTEM AND PROCESS FOR PRODUCING FUNCTIONAL GENE KNOCKDOWN CELL OR THE LIKE USING THE SAME

(54) 発明の名称: siRNA発現システムおよびこれを用いた機能遺伝子ノックダウン細胞等の生産方法

(57) Abstract: An *in vivo* siRNA expression system whereby an si (small interfering) RNA is expressed in cells. This system has an antisense code DNA encoding an antisense RNA to a domain of a target gene mRNA, a sense code DNA encoding a sense RNA in a domain of the target gene mRNA, and one or more promoters for expressing the above-described antisense RNA and the above-described sense RNA by the above-described antisense code DNA and the above-described sense code DNA.

(57) 要約:

本発明の *in vivo* siRNA発現システムは細胞内で si (短鎖干渉) RNA を発現させるシステムであって、標的遺伝子 mRNA のいずれかの領域に対するアンチセンス RNA をコードしたアンチセンスコード DNA と、前記標的遺伝子 mRNA のいずれかの領域のセンス RNA をコードしたセンスコード DNA と、前記アンチセンスコード DNA および前記センスコード DNA より前記アンチセンス RNA および前記センス RNA を発現させる一つ以上のプロモータとが備えられている。



WO 03/046186 A1

許 (BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

siRNA発現システムおよびこれを用いた機能遺伝子ノックダウン細胞等の 生産方法

技術分野

本発明は、標的遺伝子の発現を抑制し得るsiRNAのin vivo発現システムおよび、これを用いたノックダウン細胞の生産方法等に関する。

従来の技術

RNA干渉 (RNA interference、以下「RNAi」と略称する) は、標的遺伝子のmRNAと相同な配列からなるセンスRNAとこれと相補的な配列からなるアンチセンスRNAとからなる二重鎖RNA (以下、「dsRNA」と略称する) を細胞等に導入することにより、標的遺伝子mRNAの破壊を誘導し、標的遺伝子の発現を抑制し得る現象である。このようにRNAiは、標的遺伝子の発現を抑制し得ることから、従来の煩雑で効率の低い相同組換えによる遺伝子破壊方法に代わる簡易な遺伝子ノックアウト方法として、または、遺伝子治療への応用として注目を集めている。上記RNAiは、当初、線虫において発見されたが (Fire, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811, (1998))、現在では、線虫のみならず、植物、線形動物、ショウジョウバエ、原生動物などの種々の生物において観察されている (Fire, A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358-363 (1999)、Sharp, P. A. RNA interference 2001. *Genes Dev.* 15, 485-490 (2001)、Hammond, S. M., Caudy, A. A. & Hannon, G. J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature Rev. Genet.* 2, 110-111 (2001)、Zamore, P. D. RNA interference: listening to the sound of sil

ence. Nat Struct Biol. 8, 746-750 (2001))。これら生物では、実際に外来よりdsRNAを導入することにより標的遺伝子の発現が抑制されることが確認され、さらにはノックアウト個体を創生する方法としても利用されつつある。

一方、哺乳動物細胞では、他の生物と同様にdsRNAを細胞外から導入することによりRNAiの誘導が試みられたが、導入されたdsRNAにより宿主が有するウイルス感染などに対する防御機構が作動してタンパク質合成が阻害され、RNAiを観察することができなかった。

しかし、最近Tuschlらにより、他の生物で用いられているような長い二重鎖RNAに代えて、2もしくは3ヌクレオチドの一本鎖の3'末端の突出（オーバーハング）を有する全長21もしくは22ヌクレオチドの短いdsRNAを哺乳動物細胞に導入することにより、哺乳動物細胞でもRNAiを誘導し得ることが報告された（Elbashir, S. M et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature 411, 494-498 (2001)、Caplen, N. J. et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 9742-9747 (2001))。

上記の通り、哺乳動物細胞でも短鎖の干渉用RNA二重鎖（以下、「siRNA」と略称する）を用いることにより、RNAiを誘導することに成功したが、このRNAiを利用して遺伝子発現抑制による機能解析や遺伝子治療を行うためには、細胞内へのsiRNAの効率的な導入や、細胞内でのsiRNAの安定的な保持が必要になる。

しかしながら、siRNAを外来から導入する際の効率も細胞により様々であり、細胞によっては1%～10%という低い場合がある。また、哺乳動物細胞内において、外来より導入されたsiRNAは導入数日経過後に消失してしまい、遺伝子の機能を解析するための十分な安定性は有していない。また遺伝子治療では、siRNAを定期的に投与する必要性が生じるため、患者の身体的な負担が大きくなる

ことが予想される。

また、外来からsiRNAを導入する方法では、特定の組織のみでRNAiを誘導することや、発生・分化の特定の過程などでRNAiを誘導することは極めて困難である。また、siRNAは短いとは言え、RNAの合成はDNA合成に比べ格段に費用がかかり、siRNAを直接用いてRNAiを誘導することは経済性に欠ける。

他方、遺伝子の一次配列がほぼ明らかにされた現在、遺伝子の機能を迅速に解明するために、系統的かつ効率的な機能遺伝子探索方法の開発が進められている。RNAiを利用して任意の遺伝子の発現を抑制し、その細胞あるいは個体の表現型の変化から系統的に機能遺伝子の探索を行うことができれば、新規な機能遺伝子の解明をより一層加速させることができる。

発明の開示

そこで、本発明は、細胞内でより効率よく、安定かつ低廉にRNAiを産生し得る細胞内siRNA発現システム、および、このsiRNA発現システムを用いたノックダウン細胞等の生産方法、さらには、siRNA発現システムを用いて機能遺伝子の探索方法を提供することを目的とする。

本願発明者らは、上記課題に鑑みて、*in vivo* siRNA発現システムを研究し、その開発に成功した。すなわち、本発明は、具体的には、

〔1〕 細胞内でsi(短鎖干渉)RNAを発現させるシステムであって、

標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に対するアンチセンスRNAをコードしたアンチセンスコードDNAと、

前記標的遺伝子mRNAのいずれかの領域のセンスRNAをコードしたセンスコードDNAと、

前記アンチセンスコードDNAおよび前記センスコードDNAより前記アンチセンスRNAおよび前記センスRNAを発現させる一つ以上のプロモータとを備えた、siRNA発現システム、

- 〔2〕 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至49塩基対である、〔1〕記載のsiRNA発現システム、
- 〔3〕 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至35塩基対である、〔1〕記載のsiRNA発現システム、
- 〔4〕 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至30塩基対である、〔1〕記載のsiRNA発現システム、
- 〔5〕 siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中にミスマッチまたはバルジを含む、〔1〕記載のsiRNA発現システム、
- 〔6〕 ミスマッチの一方の塩基がグアニンであり、他方がウラシルである、〔5〕記載のsiRNA発現システム、
- 〔7〕 1乃至7個のミスマッチを含む、〔5〕記載のsiRNA発現システム、
- 〔8〕 1乃至7個のバルジを含む、〔5〕記載のsiRNA発現システム、
- 〔9〕 1乃至7個のバルジおよびミスマッチの両方を含む、〔5〕記載のsiRNA発現システム、
- 〔10〕 プロモータがpolIII系またはpolIII系プロモータである、〔1〕乃至〔9〕のいずれかに記載のsiRNA発現システム、
- 〔11〕 polIIIプロモータがU6プロモータである、〔1〕乃至〔10〕のいずれかに記載のsiRNA発現システム、
- 〔12〕 プロモータが誘導可能なものである、〔1〕乃至〔11〕のいずれかに記載のsiRNA発現システム、
- 〔13〕 プロモータがアンチセンスコードDNAと、センスコードDNAの上流にそれぞれ備えられている〔1〕乃至〔12〕のいずれかに記載のsiRNA発現システム、
- 〔14〕 以下の(a)～(c)のいずれかのようにloxP配列が備えられた、発現制御可能な〔1〕乃至〔13〕のいずれかに記載のsiRNA発現システム、
- (a) プロモータ内のDSEとPSEとを距離をあけて備え、その間、DSEの近傍とPS

Eの近傍とにそれぞれloxP配列を備える

(b) プロモータ活性を保持し得るように配置されたDSEとPSEとの間にloxPを備え、DSEの上流またはPSEの下流にもう一つのloxPを備える

(c) アンチセンスコードDNAまたはセンスコードDNAを挟むように二つのloxPを備える

〔15〕 アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとが同一のベクター分子上にまたは別のベクターDNA分子にそれぞれ保持された、〔1〕乃至〔14〕のいずれかに記載のsiRNA発現システム、

〔16〕 プロモータが、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAがリンカーを挟んで逆向きに連結されたユニットの片側に備えられている〔1〕乃至〔13〕のいずれかに記載のsiRNA発現システム、

〔17〕 以下の(a)～(d)のいずれかのようにloxP配列が備えられた、発現制御可能な〔16〕に記載のsiRNA発現システム、

(a) プロモータ内のDSEとPSEとを距離をあけて備え、その間、DSEの近傍とPSEの近傍とにそれぞれloxP配列を備える

(b) プロモータ活性を保持し得るように配置されたDSEとPSEとの間にloxPを備え、DSEの上流またはPSEの下流にもう一つのloxPを備える

(c) アンチセンスコードDNAまたはセンスコードDNAを挟むように二つのloxPを備える

(d) リンカーにストップ配列(例えば、TTTTT)を備え、該配列を挟むように二つのloxPを備える

〔18〕 アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとがベクター分子上に保持された、〔16〕または〔17〕に記載のsiRNA発現システム、

〔19〕 ベクターがプラスミドベクターである、〔15〕または〔18〕に記載のsiRNA発現システム、

〔20〕 ベクターがウイルスベクターである、〔15〕または〔18〕に記

載のsiRNA発現システム、

〔21〕 ベクターがダンベル型DNAベクターである、〔15〕または〔18〕に記載のsiRNA発現システム、

〔22〕 〔1〕乃至〔21〕のいずれかに記載のsiRNA発現システムを保持した細胞、

〔23〕 細胞が哺乳動物細胞である、〔22〕記載の細胞、

〔24〕 〔1〕乃至〔21〕のいずれかに記載のsiRNA発現システムを保持した生物個体、

〔25〕 〔1〕乃至〔21〕のいずれかに記載のsiRNA発現システムを含む組成物、

〔26〕 医薬組成物である、〔25〕記載の組成物、

〔27〕 標的遺伝子の発現が抑制された細胞を生産する方法であって、

〔1〕乃至〔21〕のいずれかに記載のsiRNA発現システムを細胞に導入する工程、および前記siRNA発現システムが導入された細胞を選択する工程、を含む、生産方法、

〔28〕 細胞内でsiRNAライブラリーを発現させるシステムであって、

siRNAの鎖長分の任意配列からなる二本鎖のsiRNAコードDNAと、

前記siRNAコードDNAを挟むように対向して、前記二本鎖のそれぞれの鎖から互いに相補するRNAを発現させ得る二つのプロモータと、が備えられた、siRNAライブラリー発現システム、

〔29〕 細胞内でsiRNAライブラリーを発現させるシステムであって、

アンチセンスコードDNAと該アンチセンスコードDNAと相補的なセンスコードDNAとをリンカーを挟んで逆向きに接続したステム型siRNA生成ユニットと、前記ステム型siRNA生成ユニットの片側に、ステム型siRNAを発現させ得るプロモータと、が備えられた、siRNAライブラリー発現システム、

〔30〕 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至49塩基対である、〔

〔 2 8 〕 または〔 2 9 〕 記載のsiRNAライブラリー発現システム、

〔 3 1 〕 発現されるsiRNAが転写され最終的に1 5 乃至3 5 塩基対である、〔

2 8 〕 または〔 2 9 〕 記載のsiRNAライブラリー発現システム、

〔 3 2 〕 発現されるsiRNAが転写され最終的に1 5 乃至3 0 塩基対である、〔

2 8 〕 または〔 2 9 〕 記載のsiRNAライブラリー発現システム、

〔 3 3 〕 siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中にミスマッチまたはバルジを含む、〔 2 8 〕 乃至〔 3 2 〕 のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム、

〔 3 4 〕 プロモータがpolII系またはpolIII系プロモータである、〔 2 8 〕 乃至〔 3 3 〕 のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム、

〔 3 5 〕 プロモータが誘導可能なものである、〔 2 8 〕 乃至〔 3 3 〕 のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム、

〔 3 6 〕 発現されるsiRNAが、ランダムなRNA鎖から構成される、〔 2 8 〕 乃至〔 3 3 〕 のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム、

〔 3 7 〕 コーディング領域及び／またはノンコーディング領域を含む個々の遺伝子配列に対する、個々のsiRNA発現ベクターを個々に作成し、それらをすべて集めることによって構成される、〔 2 8 〕 乃至〔 3 3 〕 に記載のsiRNAライブラリー発現システム。

〔 3 8 〕 発現されるsiRNAが、任意のcDNAまたはゲノムDNAのsiRNA鎖長分の部分断片DNAによってコードされるRNA鎖から構成される、〔 2 8 〕 乃至〔 3 3 〕 のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム、

〔 3 9 〕 〔 2 8 〕 乃至〔 3 8 〕 のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システムの集合体であって、

集合内のそれぞれのシステムより異なるsiRNAが発現される、siRNAライブラリー発現システム集合体、

〔 4 0 〕 〔 2 8 〕 乃至〔 3 8 〕 のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現シ

ステムまたは〔3.9〕記載のsiRNAライブラリー発現システム集合体を細胞に導入する工程、

前記siRNAライブラリー発現システムまたは前記集合体が導入された細胞を選択する工程、

選択された細胞の表現型を解析する工程、を含む機能遺伝子探索方法、

〔4.1〕 表現型解析により表現型が変化していた細胞中のsiRNAコードDNAの配列に基づいて機能遺伝子をスクリーニングする工程をさらに含む、〔4.0〕記載の機能遺伝子探索方法、

〔4.2〕 〔2.8〕乃至〔3.8〕のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システムまたは〔3.9〕記載のsiRNAライブラリー発現システム集合体を細胞に導入する工程、

前記siRNAライブラリー発現システムまたは前記集合体が導入された細胞において特定の遺伝子またはタンパク質の発現量を測定する工程、を含む高活性siRNA選択方法、

を、提供するものである。

本発明の第一の側面は細胞内でsiRNAを発現させるシステムに関する。このsiRNA発現システムには、標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に対するアンチセンスRNAをコードしたアンチセンスコードDNAと、前記標的遺伝子mRNAのいずれかの領域のセンスRNAをコードしたセンスコードDNAと、前記アンチセンスコードDNAおよび前記センスコードDNAより前記アンチセンスRNAおよび前記センスRNAを発現させる一つ以上のプロモータとが備えられている。

「siRNA」は、哺乳動物細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖RNAを意味し、Tuschlら（前掲）により報告された全長21～23塩基対に限定されるものではなく、毒性を示さない範囲の長さであれば特に限定はなく、例えば、15～49塩基対と、好適には15～35塩基対と、さらに好適には21～30塩基対とすることができる。あるいは、発現されるsiRNAが転写され最終的な二重鎖RNA部分

の長さが、例えば、15～49塩基対、好適には15～35塩基対、さらに好適には21～30塩基対とすることができる。siRNAにおけるRNA同士が対合した二重鎖RNAの部分は、完全に対合しているものに限らず、ミスマッチ（対応する塩基が相補的でない）、バルジ（一方の鎖に対応する塩基がない）などにより不對合部分が含まれていてもよい。不對合部分はsiRNA形成に支障がない範囲で設けることができる。本発明における上記「バルジ」は、好ましくは1乃至2塩基の不對合塩基からなり、siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中に、好ましくは1乃至7個、より好ましくは1乃至5個含まれる。また、本発明における上記「ミスマッチ」は、siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中に、好ましくは1乃至7個、より好ましくは1乃至5個含まれる。好ましくは、一方の塩基がグアニンであり、他方がウラシルであるようなミスマッチを挙げることができる。好適には、センスRNAをコードするDNAにおいて、CからTへの変異、またはGからAへの変異、もしくはこれらの変異が混在した変異であるが、特にこれらの変異に制限されない。さらに本発明においては、siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中に、バルジおよびミスマッチの両方が含まれていてもよく、siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中に、バルジおよびミスマッチを、好ましくは、合わせて1乃至7個、より好ましくは合わせて1乃至5個含まれる。

また、このように不對合部分（ミスマッチまたはバルジ等）を設けることにより、後述するアンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとの間での組換えを抑制でき、後述するsiRNA発現システムの安定化を図ることもできる。さらに、siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中に不對合部分を含まないシステムループ形DNAでは塩基配列の決定が困難であるが、上述のようにミスマッチまたはバルジを導入することによって、塩基配列の決定が可能となる。また、対合する二重鎖RNA領域中に、ミスマッチまたはバルジを含むsiRNAは、大腸菌の中、あるいは動物細胞内で安定となる利点を有する。

siRNAの末端構造は、標的遺伝子の発現をiRNA効果により抑制し得るものであれば、平滑末端あるいは粘着（突出）末端のいずれでもよい。また、粘着（突出）末端構造は、Tuschlら（前掲）により報告されたような3'末端側が突出している構造だけでなく、上記RNAi効果を誘導し得る限り5'末端側が突出している構造も含めることができる。また、突出する塩基数は、すでに報告がある2、3塩基に限定されず、RNAi効果を誘導し得る塩基数とすることができる。例えば、この塩基数としては、1～8塩基、好適には、2～4塩基とすることができる。なお、本明細書において、粘着末端構造を有するsiRNAの全長表示は、現実に対になっている中央の二本鎖部分の長さに、両端に突出している一本鎖同士を対にした長さを加算したものとする。例えば、中央が19塩基対で両端に4塩基の突出がある場合には、全長は23塩基対と表示することとする。また、この突出している配列部分は、標的遺伝子との特異性が低いため、標的遺伝子の配列と相補的（アンチセンス）配列あるいは同じ（センス）配列である必要は必ずしもない。また、siRNAによる標的遺伝子の発現抑制効果を保持し得る範囲で、例えば一端の突出部分に低分子RNA（例えば、tRNA、rRNAまたはウイルスRNAのような天然のRNA分子であってもよく、また人工的なRNA分子）を備えてもよい。

また、上記「siRNA」の末端構造は上述したように両側が断端構造を有している必要はなく、二重鎖RNAの一方の端部がリンカーRNAにより接続されたステムループ型構造であってもよい。この二重鎖RNA部分（ステム部分）の長さは上述したように、例えば、15～49塩基対と、好適には15～35塩基対と、さらに好適には21～30塩基対とすることができる。あるいは、発現されるsiRNAが転写され最終的な二重鎖RNA部分の長さが、例えば、15～49塩基対、好適には15～35塩基対、さらに好適には21～30塩基対とすることができる。また、リンカーの長さはステム部分の対合に支障のない長さであれば特に限定はない。例えば、ステムの対合の安定化およびステム部分をコードしているDNA間での組換えを抑制す

るために、リンカー部分にクロバーリーフtRNA構造を用いてもよい。また、リンカーの長さがステムの対合に支障を与える長さであっても、例えば、リンカー部分にイントロンを包含させ、前駆RNAから成熟RNAにプロセッシングされる際にイントロンが切り出されて、ステム部分が対合するような構成をとってもよい。また、ステムループ型のsiRNAの場合には、ループを備えていないRNAのいずれかの末端（頭部または尾部）に低分子RNAを備えてもよい。この低分子RNAは、上述したように、tRNA、rRNAまたはウイルスRNAのような天然のRNA分子であってもよく、また人工的なRNA分子であってもよい。

「標的遺伝子」は、その遺伝子の発現が本システムより発現されるsiRNAより抑制される遺伝子であり、任意に選択することができる。この標的遺伝子は、例えば、配列は判明しているがどのような機能を有するかを解明したい遺伝子や、その発現が疾患の原因と考えられる遺伝子などを好適に選択することができる。標的遺伝子は、そのmRNA配列の一部、すなわちsiRNAの一方の鎖（アンチセンスRNA鎖）と結合し得る長さである少なくとも15塩基以上が判明しているものであれば、ゲノム配列まで判明していない遺伝子であっても選択することができる。したがって、EST（Expressed Sequence Tag）などのmRNAの一部は判明しているが、全長が判明していない遺伝子なども「標的遺伝子」として選択することができる。

「アンチセンスRNA」は、標的遺伝子のmRNAと相補する配列からなる鎖であり、このアンチセンスRNAが標的遺伝子のmRNAと結合してRNAiを誘導すると考えられている。「センスRNA」は、上記アンチセンスRNAと相補する配列を備え、相補的なアンチセンスRNAとアニーリングしてsiRNAを生成する。これらアンチセンスRNAとセンスRNAとは、従来では、RNA合成機により合成されたが、本発明では、これらRNAはそれぞれ、siRNA発現システム中のアンチセンスRNAをコードしたDNA（アンチセンスコードDNA）、センスRNAをコードしたDNA（センスコードDNA）より細胞内で発現される。

1 2

上記アンチセンスコードDNA、センスコードDNAよりアンチセンスRNA、センスRNAを発現させるために、本発明のsiRNA発現システムには、「プロモータ」が備えられている。このプロモータは、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとを発現し得るものであれば、その種類、数、位置などは任意に定めることができる。簡易な構成としては、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAの上流にプロモータをそれぞれ備えたタンデム型発現システムとすることができる。このタンデム型発現システムでは上述した両側断端構造を有するsiRNAを生成し得る。また、ステムループ型siRNAを発現するシステム（ステム型発現システム）は、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとを逆向きに配置し、さらにこれらDNAをリンカーDNAにより接続したユニットを構築する。そして、このユニットの片側にプロモータを連結することにより、ステム型siRNA発現システムを構築することができる。なお、リンカーDNAの長さ、配列には特に限定はないが、siRNAの生成を阻害するようなターミネーション配列などでなく、および上述したように成熟RNAまで生成された際にステム部分の対合に支障のないリンカーの長さ、配列であればよい。一例としては、上述したtRNAをコードしたDNAなどをリンカーDNAなどに用いることができる。

また、タンデム型、ステム型発現システムのいずれの場合にも、5' 端にプロモータからの転写を促進し得る配列を備えてもよい。具体的にはタンデム型の場合には、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとの5' 端それぞれに、また、ステム型の場合には上記ユニットの5' 端に、プロモータからの転写を促進し得る配列を備えることにより、siRNAの生成を効率化してもよい。なお、こうした配列からの転写物は、siRNAによる標的遺伝子の発現抑制に支障がない場合には、siRNAに付加された状態で用いてもよいが、発現抑制に影響を与える場合には、トリミング手段（例えば、後述するリボザイムなど）を用いてトリミングを行うことが好ましい。

上述したタンデム型、ステム型のいずれのシステムの場合でもプロモータは

、上記各DNAより対応するRNAを産生し得るものであれば、polIII系、polIII系のいずれでもよいが、好ましくはsiRNAのような短いRNAの発現に適したpolIII系を用いることができる。このpolIII系のプロモータとしては、例えば、U6プロモータ、tRNAプロモータ、レトロウイルス性LTRプロモータ、アデノウイルスVA1プロモータ、5S rRNAプロモータ、7SK RNAプロモータ、7SL RNAプロモータ、H1 RNAプロモータなどを挙げることができる。なお、上記U6プロモータはRNAの3'末端に4塩基のウリジン塩基を付加するが、この3'末端の突出はアンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの先頭配列としてAを0、1、2、3または4塩基備えることにより、最終的に生成されるsiRNA 3'末端の突出を自在に4、3、2、1、0塩基にすることができる。なお、他のプロモータを用いた場合にも、同様に末端の突出塩基数を自在に変更することは可能である。

また、polIII系のプロモータを用いた場合には、短いRNAのみを発現させ適切に転写を終結させるために、さらにセンスコードDNA、アンチセンスコードDNAの3'末端にターミネーターを備えることが好ましい。ターミネーターは、プロモータの転写を終結し得る配列であれば、特に限定はなく、例えば、A(アデニン)塩基が4つ以上連続した配列、パリンドローム構造を形成し得る配列などを用いることができる。

一方、polIII系プロモータとしては、サイトメガロウイルスプロモータ、T7プロモータ、T3プロモータ、SP6プロモータ、RSVプロモータ、EF-1 α プロモータ、 β -アクチンプロモータ、 γ -グロブリンプロモータ、SR α プロモータなどを挙げることができる。ただし、polIII系を用いた場合には、polIII系のような短いRNAではなく、ある程度の長さのRNAとして合成される。そのため、polIII系プロモータを用いた場合には、このある程度の長さとして合成されるRNAより、例えばリボザイムなどのRNAをセルフプロセッシングにより切断し得る手段を用いて、アンチセンスRNAまたはセンスRNAを生成させるこ

ともできる。Pol III系プロモータの直後にステムループ配列を挿入し、その後ろにpolyA付加シグナルをいれて、ステムループRNAを生成させることもできる。このようなりボザイムを用いてアンチセンスRNAまたはセンスRNAを生成するためのユニットとして、次のような構成を例示することができる。すなわち、図2Aに示すように、このユニットには、上記アンチセンスコードDNAあるいはセンスコードDNAを有し、その5'端、3'端にリボザイムが認識するRNA配列をコードした領域（認識配列コード領域）がそれぞれ備えられ、さらに、この認識配列コード領域の外側にはそれぞれ隣接するように認識配列を切断する5'端、3'端切断用リボザイムがコードされた領域がそれぞれ備えられる。このようなアンチセンスRNA生成ユニットあるいはセンスRNA生成ユニットは、同一のpol III系プロモータの下流にタンデムに並べて作動可能に連結させてもよく（図2B）、また、別のプロモータの下流に作動可能にそれぞれ連結させてもよい（図2C）。なお、図2Bには両ユニットを連結させてタンデムに並べた例を示しているが、必要に応じて、アンチセンスRNA生成ユニットとセンスRNA生成ユニットとの間に任意のスペーサー配列を備えて、それぞれのユニットから発現されるRNAの間隔をリボザイムが作用しやすいように調節することもできる。

上記アンチセンスコードDNAまたはセンスコードDNAの5'端切断用リボザイム、3'端切断用リボザイムとしては、ハンマーヘッド型リボザイムなどを挙げることもできる（*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.186, pp.1271-1279 (1992); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol.90, pp.11302-11306 (1993)）。但し、セルフプロセッシングできるリボザイムである限り、他のどのような配列でもよい（*BIO medica*, Vol.7, pp.89-94 (1992)）。リボザイム自身もハンマーヘッド型リボザイムに限定するものではなく、セルフプロセッシングを行うことができるものであれば、例えば、ヘアピン型リボザイム、HDVリボザイム、テトラヒメナ由来のリボザイムなどを用いてもよい（*Gene*, Vol.122, pp.85-90 (1992)）。また、リボザイム認識配列としては、5'端、3'端切断用リボザ

イムに対応した認識配列を用いる。例えば、ハンマーヘッド型リボザイムはNUH（NはA, G, C, Uであり、HはA, C, Uである。いずれの組み合わせでもよいが、好適には最も効率良く切断される「GUC」がよい）配列の3'側でそのリン酸ジエステル結合を切断する。そのため、ハンマーヘッド型リボザイムを用いる場合には、認識配列としてNUH、好ましくはGUCを用いることができる。一例として、このハンマーヘッド型リボザイムと認識配列GUCとの組み合わせを、アンチセンスRNAまたはセンスRNAの5'端、3'端に付加し、アンチセンスRNA、センスRNAを生成させるためのmRNA構成を図2Dに示す。図2Dでは、2塩基の突出を形成させるために、アンチセンスRNA、センスRNAの5'末端を「C」としたが、3塩基のオーバーハングとする場合には、5'末端は「C」に限定されない。なお、図2Dに示す構成では、少なくともGUC配列が3'端側に付加される。

また、上記プロモータとして、誘導可能なプロモータを用いることにより、所望のタイミングでsiRNAを発現させることも可能となる。このような誘導可能なプロモータとしては、テトラサイクリンで誘導可能なU6プロモータ（Ohkawa, J. & Taira, K. Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. Hum Gene Ther. 11, 577-585 (2000)、図12）等が挙げられる。また、組織特異性のあるプロモータ、あるいはCre-LoxPシステムのようなDNA組み換えのシステムを用いて、組織特異的にsiRNAの発現を誘導してもよい。

また、上記のように薬剤等による誘導可能なプロモータを用いなくとも、例えば、組換え酵素を用いてsiRNAの生成を制御してもよい。組換え酵素としてCRE-loxPの系を用いた場合を一例として説明する（図17）。プロモータ内のDistal Sequence Element (DSE)とProxi Sequence Element (PSE)とを距離をあけて備え、その間、DSEの近傍とPSEの近傍とにそれぞれloxP配列を備える。通常は、DSEとPSEとが離れているために、プロモータ活性はオフ状態でsiRNA

の発現は抑制される。しかし、この発現系に CRE タンパク質を作用させることにより DSE の近傍と PSE の近傍とに備えられた loxP 配列間で組換えが起こり、loxP 配列間の DNA が切り出される。これによって、DSE と PSE とが接近しプロモータ活性がオン状態となって、siRNA を発現させる。この例は、CRE を作用させることにより、プロモータ活性をオンにして siRNA を生成するシステムであるが、逆に、CRE を作用させることにより、siRNA の発現を抑制するシステムを構築することもできる（図示せず）。例えば、プロモータ活性を保持し得るように配置された DSE と PSE との間に loxP を備え、DSE の上流または PSE の下流にもう一つの loxP を備える。Cre タンパク質が供給されていない場合には、プロモータ活性がオン状態であるが、Cre タンパク質が供給されると loxP 間の組換えにより DSE あるいは PSE が切り出されてプロモータ活性がオフ状態になり siRNA の生成が抑制される。また、これはプロモータ領域に loxP を配置した例であるが、アンチセンスコード DNA またはセンスコード DNA を挟むように二つの loxP を設け、CRE タンパク質の供給により siRNA の生成を抑制することもできる。

また、ステム型 siRNA 発現システムの場合には、リンカー部分にストップ配列（例えば、TTTTT）を挟むように二つの loxP を備えることができる。CRE タンパク質が供給されていない場合には、プロモータからの転写がリンカー部分のストップ配列で終結するため、siRNA の生成が抑制される。CRE タンパク質の供給により loxP 間の組換えが起こりストップ配列が切り出されると、アンチセンスコード DNA およびセンスコード DNA が転写され、ステム型 siRNA が生成される（図 28 参照）。

上記「プロモータ」、「アンチセンスコード DNA」および「センスコード DNA」を備えた siRNA 発現システムは、そのまま細胞内の染色体に導入し、細胞内でアンチセンス RNA、センス RNA を発現させ siRNA を形成させることもできるが、効率的な細胞導入などを行うために、上記 siRNA 発現システムをベクターに保持させることが好ましい。ここで用いることができる「ベクター」は、導入し

たい細胞などに対応して選択することができる。例えば、哺乳動物細胞では、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、EBウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、フォーミーウイルスベクターなどのウイルスベクターやカチオニックリポソーム、リガンドDNA複合体、ジーンガンなどの非ウイルスベクターなどが挙げられるが (Y. Niitsu ら, *Molecular Medicine* 35: 1385-1395 (1998))、これらに限定されるものではない。また、ウイルスベクターではなく、ダンベル型 DNA (Zanta M.A. et al., *Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 5;96(1):91-6)、ヌクレアーゼ耐性を持つような修飾 DNA、または naked plasmid もまた好適に用いることができる (Liu F, Huang L. *Improving plasmid DNA-mediated liver gene transfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature*. *J. Gene Med.* 2001 Nov-Dec;3(6):569-76)。本発明者らは、後述の実施例で示すように、本発明の siRNA 発現システムをダンベル型 DNA に保持させることにより、標的遺伝子の発現を効率的に抑制できることを見出した。従って、本発明の好ましい態様においては、siRNA 発現システムがダンベル型 DNA 分子上へ保持された発現システムを好適に用いることができる。また、ダンベル型の場合には細胞への導入をしやすくすることを目的として、抗体、ペプチド等と結合してもよい。

また、ベクターに siRNA 発現システムを保持させる場合の構成としては、同一のベクターからアンチセンス RNA、センス RNA を発現させる必要はなく、異なるベクターからそれぞれアンチセンス RNA、センス RNA を発現し得るように構成することができる。例えば、同一のベクターからアンチセンス RNA、センス RNA を発現させる構成としては、例えば、アンチセンスコード DNA およびセンスコード DNA の上流にそれぞれ pol III 系のような短い RNA を発現し得るプロモータを連結

させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを同方向にあるいは逆方向にベクターに挿入することにより構成することができる。このうち同方向にカセットを挿入した構成例を図1Aに示す。また、図1Bのような異なる鎖上に対向するようにアンチセンスコードDNAとセンスコードDNAと逆向きに配置した発現システムを構成することもできる。この構成では、アンチセンスRNAコード鎖とセンスRNAコード鎖とが対となった一つの二本鎖DNA（siRNAコードDNA）が備えられ、その両側にそれぞれの鎖からアンチセンスRNA、センスRNAとを発現し得るようにプロモータを対向して備えられる。この場合には、センスRNA、アンチセンスRNAの下流に余分な配列が付加されることを避けるために、それぞれの鎖（アンチセンスRNAコード鎖、センスRNAコード鎖）の3'末端にターミネーターをそれぞれ備えることが好ましい。このターミネーターは、A（アデニン）塩基を4つ以上連続させた配列などを用いることができる。また、このパリンドロームスタイルの発現システムでは、二つのプロモータの種類を異ならせることが好ましい。なお、これら発現システムでは図1Aに示すように、両側に断端構造を備えたsiRNAが生成される。

また、別の構成、上述したステム型siRNAを発現し得るシステムとして、アンチセンスDNAとセンスコードDNAとを同一DNA鎖上に逆向きに配置し、これらDNA間にリンカーを挟んで連結させたユニットを一つのプロモータの下流に接続させることもできる。その際、発現する順番は、必ずしも「アンチセンスRNAをコードするDNA→リンカー→センスRNAをコードするDNA」の順に限定されず、「センスRNAをコードするDNA→リンカー→アンチセンスRNAをコードするDNA」の順であってもよい。この構成を有する発現システムより生成されるRNAはリンカー部分をループとし、その両側のセンスRNAとアンチセンスRNAとが対合（ステム構造）となったステムループ型構造を有する。そして、細胞内の酵素によりこのパリンドロームのループ部分が切断され、siRNAを生成させることができる。

なお、この場合のステム部分の長さ、リンカーの長さ、種類などは上述した通り構成することができる。

また、図2のようなリボザイムを用いる系では、図2Bに示すシステムをベクターに挿入してもよく、また、図2Cに示す二つのカセットを同一のベクターに同方向あるいは逆方向に挿入してもよい。また、一つベクターには、複数のsiRNA（異なる標的遺伝子mRNAに対するsiRNA、同一の標的遺伝子mRNAの異なる部位に対するsiRNA、または同一標的遺伝子mRNAの同一部位に対するsiRNA）を発現し得るシステムを担持させることもできる。

また、異なるベクターからアンチセンスRNA、センスRNAを発現させる構成としては、例えば、アンチセンスコードDNAおよびセンスコードDNAの上流にそれぞれ polIII系のような短いRNAを発現し得るプロモータを連結させたアンチセンスRNA発現カセット、センスRNA発現カセットをそれぞれ構築し、これらカセットを異なるベクターに保持させることにより構成することができる。また、リボザイムを用いる系では、図2Cに示すような二つのカセットを異なるベクターに別々に保持させることにより構成することができる。

また、ベクターには、必要に応じて、ベクターが導入された細胞を選択し得る選択マーカーなどをさらに保持させることができる。選択マーカーとしては、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子のような薬剤耐性マーカー、ガラクトシダーゼなどの酵素活性を指標に選択し得るマーカー、あるいは、GFPなどの蛍光発光などを指標に選択し得るマーカーなどが挙げられる。また、EGFレセプター、B7-2、またはCD4などの表面抗原を指標に選択し得る選択マーカーなども用いてもよい。このように選択マーカーを用いることにより、該ベクターが導入された細胞、すなわち、siRNA発現システムが導入された細胞のみを選択することが可能となる。そのため、従来のようにsiRNA断片を外来から導入する際の導入効率の低さを解消し、siRNAが発現している細胞のみを濃縮することも可能となる。また、

ベクターを用いることにより、細胞内での保持時間を高め、またベクターによってはレトロウイルスベクターなどのように染色体へのインテグレーションを誘導するため、siRNA発現システムからのsiRNAの細胞内での安定的な供給を行うことが可能となる。

本発明は、上記siRNA発現システムを保持した細胞に関する。このsiRNA発現システムを導入する細胞は、siRNAは従来RNAiの誘導が困難であった哺乳動物細胞においてRNAiを誘導し得るものであることから、哺乳動物細胞であることが好ましい。また、植物細胞などの長鎖のdsRNAでは、長期の安定な発現保持が難しい細胞も、本siRNA発現システムを導入される細胞として好適である。しかし本発明の上記細胞としては、哺乳動物細胞、植物細胞に特に限定されず、例えば、哺乳動物以外の動物細胞、酵母、菌類等であってもよい。

また、上記細胞への上記siRNA発現システムの導入方法は、細胞の種類により任意に選択することができる。例えば、哺乳動物細胞への導入では、リン酸カルシウム法(Virology, Vol.52, p.456 (1973))、エレクトロポレーション法(Nucleic Acids Res., Vol.15, p.1311 (1987))、リポフェクション法(J. Clin. Biochem. Nutr., Vol.7, p.175 (1989))、ウィルスにより感染導入方法(Sci. Am., p.34, March (1994))、ジーンガンなどから選択することができ、植物細胞への導入では、エレクトロポレーション法(Nature, Vol.319, p.791 (1986))、ポリエチレングリコール法(EMBO J., Vol.3, p.2717 (1984))、パーティクルガン法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.85, p.8502 (1988))、アグロバクテリウムを介した方法(Nucleic Acids Res., Vol.12, p.8711 (1984))等により行うことができる。

上記siRNA発現システムが導入された細胞を選択する方法としては、siRNA発現システムに特異的なDNA配列をプローブあるいはプライマーとしてハイブリダイゼーション、PCRなどの公知の手法により選択することもできるが、選択マーカーを備えたベクターにsiRNA発現システムが保持されている場合には、その選

択マーカーによる表現型を指標に選択することができる。

上記の通り、siRNA発現システムが導入された細胞は、標的遺伝子の発現が抑制されたノックダウン細胞となる。ここで「ノックダウン細胞」には、標的遺伝子の発現が完全に抑制された細胞と、標的遺伝子の発現が完全には抑制されていないが低減されている細胞とが含まれる。従来、このような細胞は、標的遺伝子のあるいはその制御領域を欠損・改変させることにより創生されていたが、本siRNA発現システムを用いることにより、染色体上の標的遺伝子を改変することなく、単にsiRNA発現システムを導入し、導入された細胞を選択するという簡易な方法により標的遺伝子の発現が抑制された細胞を作ることができる。このように創生されたノックダウン細胞は、標的遺伝子の機能解析のための研究材料として、また疾患原因遺伝子を標的遺伝子として発現が抑制されている細胞では疾患モデル細胞などとして利用することが可能となる。また、生殖細胞に上記siRNA発現システムを導入し、この本システムを保持した生殖細胞より生物個体を発生させることにより、標的遺伝子ノックダウン動物、疾患モデル動物などを創生することも可能となる。

上記siRNA発現システムを用いた標的遺伝子ノックダウン動物の作製方法は特に限定はなく、既知のいずれの方法を用いてもよい。一例を示せば、siRNA発現ベクターをF₁のメス（例えば、CBA/J×C57BL/6J）とオス（例えば、C57BL/6J）とを交配して得られた受精卵に注入する。受精卵から発生させたマウスの尾部から末梢血DNAを得て、発現ベクターの一部をプローブに用いてゲノミックサザンブロットを行い、染色体にsiRNA発現ベクターが組み込まれた陽性の創始動物を同定する。C57BL/6JまたはF₁（CBA/J×C57BL/6J）ハイブリッドマウスのいずれかとの戻し交配を繰り返して後代マウスを得る。そして、ゲノミックサザンブロット解析およびPCR解析により、遺伝子組換え陽性の子孫を同定する。

また、上記では主に哺乳動物にsiRNA発現システムを用いる場合を説明したが、本発明のsiRNA発現システムは植物に用いてもよい。特に、従来の二重鎖RNA

を直接植物細胞に導入してRNAiを誘導していたが、細胞を継代している過程でdsRNAが欠落しRNAiの効果を維持することが困難であった。そのため、本発明のRNA発現システムを用いて、植物細胞中の染色体にインテグレーションさせることにより、RNAiの効果を維持することが可能となる。また、こうした細胞よりトランスジェニック植物を創生することにより、RNAi効果を安定的に保持した植物を創生することもできる。なお、植物の創生は、当業者においては、周知の方法により実施することが可能である。

また、本発明は上記siRNA発現システムを含む組成物に関する。本siRNA発現システムは、siRNAにより所望の標的遺伝子の発現を抑制し得るため、このシステムにより疾患の原因となる遺伝子発現を抑制し得ることもできる。このようなsiRNAを発現するシステムは、適切な賦形剤を添加した医薬組成物などとして用いることもできる。

本発明の他の態様は、細胞内でsiRNAライブラリーを発現させるシステムに関する。本発明における「siRNAライブラリー」によって発現されるsiRNAは、アデニン、グアニン、シトシン、またはウラシルをsiRNA鎖長分だけ順列に並べ得る配列からなるRNA鎖から構成される、もしくは任意のcDNAまたはゲノムDNAのsiRNA鎖長分の（ランダムな）部分断片DNAによってコードされるRNA鎖から構成される。このような上記siRNAを本明細書においては、「ランダム（な）siRNA」とも記載する。即ち、本発明において「ランダムsiRNA」とは、配列が任意の配列、あるいは、特定のcDNA配列もしくは特定のcDNAライブラリーに含まれる配列およびゲノム配列から選ばれる任意の配列から構成される。上述までのsiRNA発現システムは特定の標的遺伝子の発現を抑制し得るものであるが、本発明では、siRNAライブラリーを発現して、任意の遺伝子、例えば機能未知の遺伝子や配列未知の遺伝子を抑制し、新規な機能遺伝子を探索するために用いることができる。一例とすれば、siRNAライブラリー発現システムは、図1Bに示すような構成を取ることができる。中央にランダムなアンチセンスRNAをコードした

23

DNAとこのDNAと相補的なセンスRNAをコードしたDNAとが対合した二本鎖のsiRNAコードDNA（以下「siRNAコードDNA」という）を備え、このsiRNAコードDNAを挟むように対向して、アンチセンスRNAとセンスRNAをそれぞれ発現させ得る二つのプロモータが備えられる。

上記「ランダムな siRNA」は、配列が任意の配列、あるいは特定の cDNA 配列、特定の cDNA ライブラリーに含まれる配列またはゲノム配列から選ばれる任意の配列であることを除いて、上述の siRNA 発現システムと同様であり、哺乳動物細胞内で毒性を示さない範囲の短鎖からなる二重鎖 RNA から構成される。短鎖とは、Tuschl ら（前掲）により報告された全長 21～23 塩基対に限定されるものではなく、毒性を示さない範囲の長さであれば、例えば、15～49 塩基対と、好適には、15～35 塩基対と、さらに好適には 21～30 塩基対とすることができる。また、上記ランダム siRNA の末端構造は、標的遺伝子の発現を RNAi 効果により抑制し得るものであれば、平滑末端あるいは粘着（突出）末端のいずれでもよい。また、粘着（突出）末端構造は、3' 末端側が突出している構造だけでなく、上記 RNAi 効果を誘導し得る限り 5' 末端側が突出している構造も含めることができる。また、突出する塩基数は、2, 3 塩基に限定されず、RNAi 効果を誘導し得る塩基数とすることができる。例えば、この塩基数としては、1～8 塩基、好適には、2～4 塩基とすることができる。また、上述したように一端の突出部分に低分子 RNA を備えた構成としてもよい。また、siRNA ライブラリー発現システムによって発現される siRNA は、上述のように、RNA 同士が対合する二重鎖 RNA 領域中にミスマッチもしくはバルジ、あるいはその両方を含んでいてもよい。

また、siRNA ライブラリーを発現させるシステムは、上述したような構成（siRNA コード DNA を挟むように対向して二つのプロモータを備えた構成）に限られず、ステム型の siRNA を発現させ得るような構成をとることもできる。すなわち、一方のアンチセンス RNA（例えば、ランダムな任意配列、あるいは特定の cDNA 配列、特定の cDNA ライブラリーに含まれる配列またはゲノム配列から選ば

れる任意の配列) をコードした DNA とそれと相補するセンス RNA をコードした DNA とを逆向きにし、これらをリンカー DNA により接続したユニット (以下、「ステム型 siRNA ライブラリー生成ユニット」という) の上流にプロモータを連結した構成をも本発明に含まれる。上記ステム型 siRNA ライブラリー生成ユニットの作製方法の一例を図 18 に示す。すなわち、DNA 合成機等により中央部にランダムな配列からなるアンチセンス RNA をコードした DNA (アンチセンスコード DNA) 配列と 3' 末端側に任意のパリンドローム構造を形成し得る配列とを備えた一本鎖 DNA を合成する。次いで、この一本鎖 DNA の 5' 側に相補的なプライマーを準備し、このプライマーをアニーリングさせるとともに、一本鎖 DNA 上の 3' 側にパリンドローム構造を形成させる。この状態で、DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼを作用させ、アンチセンスコード DNA と相補し得るセンスコード DNA 鎖が合成されるとともにステム部分が延長したパリンドローム構造が形成される。このパリンドローム構造を変性処理により一本鎖とし、アンチセンスコード DNA およびセンスコード DNA を挟む両側配列と相補するプライマーを用いた PCR により、ステム型 siRNA ライブラリー生成ユニットを含む二本鎖 DNA が生成される。この二本鎖 DNA のステム型 siRNA ライブラリー生成ユニットの側鎖を必要に応じて、制限酵素などによりトリミングした後、適当なプロモータの下流に接続して、ステム型 siRNA ライブラリー発現システムが生成される。

なお、上記ステム型 siRNA ライブラリー発現システムからはステムループ型の siRNA が生成される。このステムループ型の siRNA においても、上述の通り、生成される二重鎖 RNA 部分 (ステム部分) の長さは、例えば、15~49 塩基対と、好適には 15~35 塩基対と、さらに好適には 21~30 塩基対とすることができる。また、リンカーの長さおよび配列は、ステム部分の対合に支障のない長さおよび配列であれば特に限定はなく、例えば、クロバリーフ tRNA などの低分子 RNA を設けてもよい。

上記「ランダムなアンチセンスコード DNA」は、任意の配列から構成され、例

例えば、4塩基「A, G, C, T」を鎖長分だけ順列により並べ得る配列の集合の中から任意に選択することができる。あるいは、特定のcDNA配列もしくは特定のcDNAライブラリーに含まれる配列またはゲノム配列から選ばれる任意の配列から構成される。また、ここで用いることができるプロモータはpolIII系、polIII系のいずれでもよいが、好ましくはsiRNAのような短いRNAの発現に適したpolIII系を用いることが好ましい。また、対向するプロモータ同士は、同一の種類、異なる種類のいずれであってもよいが、発現効率の点から好ましくは異なる種類とすることがよい。なお、これらpolIII系、polIII系のプロモータとして用い得る例は上述と同様である。

また、polIII系プロモータを用いた場合には、相補する短いRNAを発現した後適切に転写を終結させるため、図1Bに示すように二つのプロモータとsiRNAコードDNAとの境界にターミネーターを備えることが好ましい。ターミネーターは図1Bに示すようなA（アデニン）塩基を4つ以上連続した配列を用いてもよく、また、当業者に公知のターミネーターなどを用いてもよい。

また、上記プロモータとして、誘導可能なプロモータを用いることにより、所望のタイミングでsiRNAライブラリーを発現させることも可能となる。そのため、誘導可能なプロモータを用いることにより特定の発生・分化段階等で機能する遺伝子の解析を行うことが可能となる。また、転写活性が組織特異性のあるプロモータを利用した場合には、組織特異的にsiRNAの発現を誘導することが可能となる。そのため、特定の組織での機能遺伝子の解析を行うことが可能となる。なお、ここで用いることができる誘導可能なプロモータ、組織特異的プロモータは上記と同様である。上記siRNAライブラリー発現システムは、DNA断片としてそのまま細胞内の染色体に導入してもよいが、効率的な細胞導入などを行うために、上記siRNAライブラリー発現システムをベクターに保持させることが好ましい。ここで用いることができる「ベクター」は、上述したベクターと同様である。また、一つベクターには、複数の種類のsiRNAを発現し得るsiRN

Aライブラリー発現システムを保持させて、機能遺伝子のスクリーニングの効率化を図ることもできる。また、上記siRNAライブラリー発現システムを保持したベクターには、必要に応じて、選択マーカーなどをさらに保持させることができる。ここで用いることができる選択マーカーは、上記と同様である。このように選択マーカーを用いることにより、該ベクターが導入された細胞、すなわち、siRNAライブラリー発現システムが導入された細胞のみを選択することが可能となり、機能遺伝子の探索の効率化を図ることができる。

また本発明のsiRNA発現システムの一つの態様としては、コーディング領域及び／またはノンコーディング領域を含む個々の遺伝子配列に対する、個々のsiRNA発現ベクターを個々に作成し、それらをすべて集めることによって構成されるsiRNAライブラリー発現システムである。

また、それぞれ異なるsiRNAを発現し得るsiRNAライブラリー発現システムを集めて集合体を構築することもできる。例えば、この集合体より発現されるsiRNAとして、4塩基「A, G, C, U」をsiRNA鎖長分だけ順列により並べ得る配列からなるRNA鎖を生成し得るようにsiRNAコードDNA、ステム型siRNAライブラリー発現システムを構成してもよく、また、任意のcDNA断片もしくは任意のcDNAライブラリーに含まれる配列またはゲノム配列から選ばれる任意の配列を用いてsiRNAコードDNAを構成してもよい。このようにsiRNAライブラリー発現システムを複数集めた集合体を用いることにより、機能遺伝子の探索を一層効率的に行うことが可能となる。

上記ランダムsiRNAライブラリー発現システムまたは上記記載のsiRNAライブラリー発現システムの集合体を用いて、機能遺伝子を探索する方法としては、siRNAライブラリー発現システムまたは上記記載のsiRNAライブラリー発現システムの集合体を細胞に導入する工程、前記siRNAライブラリー発現システムまたは前記集合体が導入された細胞を選択する工程、選択された細胞の表現型を解析する工程、から構成することができる。

siRNAライブラリー発現システム等の細胞への導入は、上記と同様、細胞によって選択することができる。具体的には、哺乳動物細胞への導入では、リン酸カルシウム法(Virology, Vol.52, p.456 (1973))、エレクトロポレーション法(Nucleic Acids Res., Vol.15, p.1311 (1987))、リポフェクション法(J. Clin. Biochem. Nutr., Vol.7, p.175 (1989))、ウィルスにより感染導入方法(Sci. Am., p.34, March (1994))、ジーンガンなどから選択することができ、植物細胞への導入では、エレクトロポレーション法(Nature, Vol.319, p.791 (1986))、ポリエチレングリコール法(EMBO J., Vol.3, p.2717 (1984))、パーティクルガン法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.85, p.8502 (1988))、アグロバクテリウムを介した方法(Nucleic. Acids Res., Vol.12, p.8711 (1984))等により行うことができる。

siRNAライブラリー発現システム等が導入された細胞の選択は、選択マーカーを有するベクターを備えている場合には、その選択マーカーによる表現型により導入されている細胞を回収することにより選択することができる。また、選択マーカーを備えていない場合には、siRNAライブラリー発現システムに共通し、これらに特有の配列をプローブまたはプライマーとして、公知のハイブリダイゼーションまたはPCRなどにより導入細胞を検出することにより選択することができる。

上記siRNAライブラリー発現システムまたはその集合体が導入された細胞が選択された後に、その細胞の表現型を解析する。この表現型の解析は、コントロールとしてsiRNAライブラリー発現システム等が導入されていない細胞等の表現型と比較することにより行うことができる。この表現型は、細胞表面に生じるものだけではなく、例えば、細胞内の変化なども含まれる。

上記解析の結果、表現型が変化した細胞には、何らかの機能遺伝子の発現を抑制し得るsiRNAライブラリー発現システムが含まれている可能性が高い。そのため、機能遺伝子をスクリーニングするために、この細胞に含まれるsiRNAコー

ドDNAの配列に基づき、プローブ、プライマーを構築する。そして、このプローブ、プライマーを用いて、ハイブリダイゼーションまたはPCRを行うことにより、機能遺伝子のクローニングを行うことができる。また、siRNAコードDNAの配列に基づいて、データベースから機能遺伝子を検索することもできる。

本発明のsiRNA発現システムの効果は、通常、標的となる遺伝子のターゲットサイトの場所により大きく異なる。例えば、HIVを標的とした場合、プライミングサイトを狙うことにより、siRNAによる高い発現抑制効果が期待できる。好適なターゲットサイトが不明である場合にも、本発明のsiRNAライブラリー発現システムは有効である。即ち、本発明の上記siRNAライブラリー発現システムは、mRNAを壊すのに有効なsiRNAの至適ターゲットサイトを検索するシステムとして非常に有用である。即ち本発明は、本発明のsiRNAライブラリー発現システムまたは本発明のsiRNAライブラリー発現システム集合体を細胞に導入する工程、前記siRNAライブラリー発現システムまたは前記集合体が導入された細胞において特定の遺伝子またはタンパク質の発現量を測定する工程、を含む高活性siRNA選択方法を提供する。任意の遺伝子またはタンパク質の発現量の測定は、当業者においては周知の方法、例えば、ノーザンブロットハイブリダイゼーションまたはウェスタンブロットハイブリダイゼーション法等により、容易に実施することが可能である。

本発明のsiRNA発現システム、およびsiRNAライブラリー発現システムの利用は、哺乳動物に特に限定されず、その他の動物、植物、酵母、菌類等にも使用することができる。

本発明のsiRNA発現ライブラリーの使用方法として、たとえば、ウイルス感染に関わる遺伝子を調べることが考えられる。その場合、siRNA発現ライブラリーを細胞に導入し、細胞にウイルスを感染させ、生き残る細胞を調べることにより、簡単にウイルス感染に関わる遺伝子が同定できる。このとき使用するライブラリーとしては、ヒト4万個のcDNAに対応するsiRNA発現ライブラリーを用いれ

ば、すべて、関連する遺伝子を同定可能であり、また、ランダムイズ、あるいはゲノム断片のsiRNA発現ライブラリーを用いれば、cDNA以外の関連遺伝子の同定も可能となる。また、これら2つのライブラリーを混ぜて用いても良い。

図面の簡単な説明

図1は、U6プロモータを用いたsiRNA発現システムおよび、これをこれを用いてsiRNAを生成するための方法を示す図である。(A) 二つのU6 プロモータは、センスとアンチセンスとの短鎖RNAを生成し、この生成の際にRNAの3'末端には4つのUを付加する。そして、発現されたセンスおよびアンチセンスRNAはアニールして、3'末端に4塩基の突出を備えたsiRNA 二重鎖を形成する。(B) パリンドロームタイプの発現システムを示す。中央に、センスコードDNAとアンチセンスコードDNAとが二重鎖になったsiRNAコードDNAを備え、その両端にプロモータが備えられ、これらプロモータからセンスRNA、アンチセンスRNAが発現される。

図2は、リボザイムを用いてsiRNAを生成されるための構成例を示す図である。

図3は、ハイグロマイシン/EGFPを発現している細胞にEGFPに対するsiRNA発現システムを導入し、EGFPの発現抑制効果を示す写真である。左のパネル(A, D, G, J)は、Hygromycin/EGFPの発現を示す。中央のパネル(B, E, H, K)は、DsRedの発現を示す写真である。右のパネル(C, F, I, L)は、Hygromycin/EGFPとDsRedの発現を重ね合わせた結果を示す。

図4は、ルシフェラーゼ活性を有するHeLaS3細胞に ウミシイタケまたはホタルルシフェラーゼに対するsiRNAを発現するシステムを導入した際の効果を示す図である。Aに示す値は、ホタルルシフェラーゼに対するsiRNAを導入した群は、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を基に標準化し、ウミシイタケルシフェラーゼに対するsiRNAを導入した群は、ホタルルシフェラーゼ活性を基に標準化し

た。Bはホタルまたはウミシイタケルシフェラーゼに対するsiRNAを発現するシステムを濃度依存的に導入した際の各ルシフェラーゼの抑制効果を示した。

図5は、同一標的遺伝子（ホタルルシフェラーゼ）の異なる標的部位に対するsiRNAまたはsiRNA発現システムのシリーズを用いて、発現抑制活性を解析した結果を示す図である。Aは種々の標的部位に対するsiRNA発現ベクターを導入した際の発現抑制活性を解析した結果を示し、Bは標的部位の異なるsiRNAを濃度を変えて外来より直接導入した際の結果を示す。

図6は、siRNAオリゴヌクレオチドの3'末端の長さによる発現抑制への影響を調べた結果（A）、二つの標的遺伝子または二つの標的部位に対するsiRNA発現システムにより発現抑制効果（B）を示す図である。Bにおいて、ルシフェラーゼ活性値はインターナルコントロールとして導入した β -ガラクトシダーゼ活性により標準化した。

図7は、内因性の β カテニン遺伝子の発現をsiRNA発現システムにより抑制し得るかを解析した結果を示す写真である。図において、パネルA、B、Cは β カテニンに対するsiRNAを発現するベクター（pHygEGFP/i β -catenin）を導入した群であり、D、E、Fは空のベクターを（pHygEGFP）を導入した群であり、これら群は全て抗 β カテニン抗体により染色した。また、左側のパネル（A、D）はHygromycin/EGFPの発現を、中央のパネル（B、E）は β カテニンの発現を、そして右側のパネル（C、F）は、これらを重ねあわせたイメージを示す。

図8は、タンデム型siRNAとステム型siRNAのRNAi効果を比較解析した結果を示す図である。pU6tandem19はタンデム型、pU6stem19はステム型のsiRNA発現ベクターである。Cont.は対照（空のベクター）を表す。

図9は、種々のsiRNA発現ベクターにおける発現抑制効果を解析した結果を示す図である。

図10は、サイトメガロウイルス由来プロモータ（CMVプロモータ）、およびtRNAプロモータを備えたsiRNA発現ベクターにおける発現抑制効果を解析した結果

を示す図である。

図11は、ミスマッチまたはバルジを含むsiRNA二本鎖のRNAi誘導効果を解析した結果を示す図である。

図12は、Tet-ONシステムの原理を模式的に示す図である。テトラサイクリン非存在下においては、テトラサイクリンリプレッサータンパク質がU6プロモータへ結合するため転写が抑制される。一方、テトラサイクリンが存在すると、テトラサイクリンがテトラサイクリンリプレッサータンパク質と結合し、U6プロモータから遊離するため、転写がオンになる。

図13は、テトラサイクリンで誘導可能なプロモータを有するsiRNA発現ベクターによるRNAiの誘導効果を示す図である。U6Tetiはテトラサイクリンオペレータ配列をU6プロモータ中に含むsiRNA発現ベクターを、U6iは該配列を含まないsiRNA発現ベクターを表す。

図14は、トリミングリボザイムを含むRNA転写物におけるオートマチック切断の様式を模式的に示す図である。

図15は、トリミングリボザイムのセルフプロセッシングによるsiRNAの生成の様式を示す図である。黒三角で示す場所で塩基の切断が起こり、siRNAが生成される。

図16は、RNAセルフプロセッシングによるsiRNAの生成を示すゲル電気泳動の写真である。21ntのsiRNAに相当するバンドを矢印で示す。

図17は、Cre-loxシステムを用いてsiRNAの発現を制御する構成の一例を示す図である。

図18は、ステム型のsiRNAライブラリー発現システムの作製方法の一例を模式的に示す図である。

図19は、siRNAライブラリー発現システムの作製方法の一例を示す図である。

①は、19bp～29bpの脱リン酸化平滑末端をもつランダムなDNA断片を示す。

3 2

②は、①の両端に5'リン酸化ヘアピン型DNAリンカー1をライゲーションさせた図である。

図20は、図19の続きの図である。

③は、Bst DNA PolymeraseによるNick部位からの鎖置換反応図である。

④は、DNAリンカー2をライゲーションした図である。

図21は、図20の続きの図である。

⑤は、Bst DNA PolymeraseによるNick部位からの鎖置換反応図である。

⑥は、⑤に対するAscIによる切断図である。

図22は、図21の続きの図である。

⑦は、siRNAライブラリー発現プレ・ライブラリーの図である。

⑧は、siRNAライブラリー発現プレ・ライブラリーのBspMI切断図である。センスコードDNAとアンチセンスコードDNAの間にLoop配列TTCGを入れる場合は、ステップ⑧-2へ進む。

⑨は、Klenow Fragmentによる平滑化、DNAリンカー1除去、自己連結の結果の、siRNAライブラリー発現システム完成図である。

図23は、図22の続きの図である。

⑧-2は、上記⑧において、センスコードDNAとアンチセンスコードDNAの間にLoop配列TTCGを入れる場合の図である。siRNAライブラリー発現プレ・ライブラリーをBsgIで切断する。

⑧-3は、BspMIによる切断図である。BsgIで切断された側はBspMI切断ができない。

⑨-2は、T4 DNA Polymeraseによる平滑化、DNA1リンカー除去、自己連結の結果の、siRNAライブラリー発現システムの完成図である。

図24は、約20bp～25bp EGFP cDNA断片の調製を模式的に表わした図である。最終産物である、脱リン酸化平滑化末端をもつランダムな約20-25bpのEGFP cDNA断片は、図19①における材料となる。

図25は、クローニングベクターの調製を模式的に表わした図である。使用したプロモータは、ヒトU6プロモータ、あるいは、ヒトtRNAプロモータである。U6プロモータ保持クローニングベクターは、BspMI、Klenowで調製、tRNAプロモータ保持クローニングベクターは、BseRI、T4 DNA Polymeraseで調製した。

図26は、EGFP蛍光強度を共焦点顕微鏡で観察した結果を示す写真である。

図27は、pUC18, U6 GFP25 siRNA lib-loop-, U6 GFP25 siRNA lib TTCG, tRNA GFP25 siRNA lib loop-, tRNA GFP25 siRNA lib TTCGの各サンプルにおけるEGFPの蛍光強度を、トランスフェクションの24時間および48時間後に計測し相対的に比較した図である。

図28は、リンカー部分にストップ配列を挟むように二つのloxPを備えた、ステム型siRNA発現システムを模式的に示す図である。

図29は、siRNA発現アデノウイルスベクターによる発現抑制効果を示す図である。

図30は、siRNA発現HIVベクターによる発現抑制効果を示す図である。

図31は、siRNA発現ダンベル型ベクターによる発現抑制効果を示す図である。

図32は、siRNAのRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中にミスマッチまたはバルジを含むsiRNA発現システムにおける発現抑制効果を示す図である。各配列先頭の括弧内は、配列番号を示す。

発明を実施するための最良の形態

[実施例1] siRNA発現ベクターによるRNAiの誘導

外来から導入したハイグロマイシン／EGFP融合タンパク質をコードした標的遺伝子の発現をsiRNA発現ベクターにより抑制し得るか否かを検討した。

ハイグロマイシン／EGFP発現ベクター (pHygEGFP) とインターナルコントロールのDsRedを発現するベクター (pDsRed2) を入手した (Clontech)。siRNA発

現ベクターは、ヒトU6プロモーターを保持したプラスミドpU6 (Ohkawa, J. & Taira, K. Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. *Hum Gene Ther.* 11, 577-585 (2000)) を用いて構築した。ハイグロマイシン/EGFPのセンスRNAおよびアンチセンスRNAの一部をコードしたDNAを含む断片をDNA合成機により合成し、合成断片をpU6のU6プロモータの直下にサブクローニングした。U6プロモータの直下にこれら増幅断片を挿入するために、サブクローニングに用いたベクターにはU6の下流にBspMIの認識部位と、さらにその下流に別のBspMIの認識部位を設け、U6プロモータの直下とさらに下流がBspMIにより切断されるように構成した。切断後は4塩基の粘着末端が形成されるため、これら粘着末端と相補する末端を備えた合成センスコードDNAを挿入することによりセンスRNAを発現し得るベクターを構築した。

同様にアンチセンスRNA (19ヌクレオチド) をコードしたDNAもPCRにより増幅し、pU6のU6プロモータの直下にサブクローニングした。

このU6プロモータを備えたアンチセンRNA発現カセットをベクターから切り出し、センスRNA発現カセットを備えたpU6 ベクター に挿入して、siRNA発現ベクター (pU6iHyg/EGFP) を構築した。ここで、U6プロモータを用いた場合、発現されるmRNAの3'末端には、4つのウリジン (U) が付加されることが報告されていることから、siRNA発現ベクターより発現され、細胞内で形成されるsiRNAは、両3'末端が4ヌクレオチドの突出した構造を有する。すなわち、このsiRNA発現ベクターからは、中央に19ヌクレオチドの二重鎖領域を有し、両3末端に4ヌクレオチドの突出を備えた、全長23ヌクレオチドのsiRNAが発現される (図1A)。

上記pHygEGFP (1 μ g)、pDsRed2 (0.5 μ g)、およびpU6iHyg/EGFP (1 μ g) をヒトHeLaS3細胞にリポフェクション法 (リポフェクトアミン2000) コトランスフェクションした。トランスフェクション48時間後に37°Cで静置した後、共

焦点顕微鏡で観察した。なお、コントロール実験として、siRNA発現ベクターに代えてpU6を用いて同様の操作を行った。

図3において、上段はコントロールのpU6を用いた結果を示し、下段はpU6iHyg/EGFPを導入した結果を示す。図3中央に示すように、赤色の蛍光を発するインターナルコントロールのpDsRedが導入された細胞では、コントロール群とpU6iHyg/EGFP導入群とで有意な差はなかった。そのため、両実験群でベクターの導入効率に差異はなく、またsiRNA発現ベクターによる非特異的な発現抑制がないことが示された。一方、図3左に示すように、pHygEGFPによる緑色の蛍光を発する細胞はコントロールに比べ、pU6iHyg/EGFP導入群で減少しており、また、緑色を発光している細胞でのその蛍光発光強度が低下していた。また、同様に、図3右に示すように、赤、緑、の蛍光を重ね合わせた場合でも、緑色を発する細胞および、赤と緑との混合による黄色を発する細胞は、コントロールに比べ、siRNA発現ベクター導入群では、減少していた。このことより、siRNA発現ベクターの導入により、RNAiが誘導され、標的遺伝子の発現抑制が示された。また、同様の解析をマウスCOS7細胞を用いて行った。その結果、pDsRedの発現には全く影響がないが、pHygEGFPの発現を特異的に抑制した（図示せず）。

[実施例2] siRNA発現ベクター導入による発現抑制活性の定量

RNAiの効果を定量化するために、他のレポーター遺伝子として、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼを用い、その発現の抑制活性を以下の通り解析した。

HeLaS3細胞とCOS7細胞を10%ウシ胎児血清含有ダルベッコウ変法イーグル培地で培養した。各培養細胞（ 3×10^4 cells/ウェル）を48ウェルプレートの各ウェルに播いた。ルシフェラーゼレポーター解析を行うために、30 ngのRSV-ウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター（pRL-RSV）¹⁵、30 ngのホタルルシフェラーゼ発現ベクターpGL3（Promega）および様々な量のホタルルシフェラ

ーゼまたはウミシイタケルシフェラーゼに対するsiRNA発現ベクターを各ウェルにコトランスフェクションした。トランスフェクションはリポフェクトアミン2000試薬(Life Technologies)を用いリポフェクション法により行った。

HeLaS3細胞でのルシフェラーゼ解析結果を図4に示す。図4Aは、一定量(300ng)のsiRNA発現ベクターを導入した結果を示し、siRNAを導入することにより対応する標的遺伝子の発現が抑制された。また、センスあるいはアンチセンスRNAのいずれか一方のみを発現するプラスミドでもルシフェラーゼ活性を解析したが、両プラスミドともにホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの発現に全く影響を与えなかった。また、図4Bには、siRNAの導入量を変えた際の結果を示す。ホタルルシフェラーゼに対するsiRNA発現ベクターは、ウミシイタケルシフェラーゼの活性に影響を与えることなく、ホタルルシフェラーゼ活性を濃度依存的に低下させた。一方、ウミシイタケルシフェラーゼに対するsiRNA発現ベクターをトランスフェクションした細胞では、ウミシイタケルシフェラーゼ活性を濃度依存的に低下させた。これらの結果よりU6プロモータを用いたsiRNA発現システムは、特異的にまた効果的に標的遺伝子の発現を抑制した。

〔実施例3〕 標的部位に依存した発現抑制

次に、同一転写産物中の異なる標的部位に対するsiRNAを発現するベクターが、異なる発現抑制活性を有するか否かを検討した。なお、この解析では、ホタルルシフェラーゼ転写産物中の4つの異なる標的部位に対するsiRNA発現ベクターを、実施例2と同様の条件でホタルルシフェラーゼ発現ベクターおよびインターナルコントロールのウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクターと共にHeLaS3細胞にトランスフェクションを行った。なお、この4つの異なる標的部位に対するsiRNA発現ベクターのセンス、アンチセンスコードDNA配列を以下に示す。

ホタルルシフェラーゼ0部位センス鎖：5'-GCTATGAAACGATATGGGC-3' (配列番号：1)、

37

0部位アンチセンス鎖：5'-GCCCATATCGTTTCATAGC-3'（配列番号：2）、A部位センス鎖：5'-GTTTCGTCACATCTCATCTAC-3'（配列番号：3）、
 A部位アンチセンス鎖：5'-GTAGATGAGATGTGACGAA-3'（配列番号：4）、B部位センス鎖：5'-GTGCGCTGCTGGTGCCAAC-3'（配列番号：5）、
 B部位アンチセンス鎖：5'-GTTGGCACCAGCAGCGCAC-3'（配列番号：6）、C部位センス鎖：5'-ATGTACACGTTTCGTCACAT-3'（配列番号：7）、
 C部位センス鎖5'-ATGTGACGAACGTGTACAT-3'（配列番号：8）、
 コントロールのウミシイタケルシフェラーゼ（センス鎖塩基突出）：5'-GTAGCGCGGTGTATTATAC-3'（配列番号：9）、（アンチセンス鎖塩基突出）5'-GTATAATACACCGCGCTAC-3'（配列番号：10）。

図5Aに示すように、標的部位の違いによりルシフェラーゼの抑制活性に差異が見られた。すなわち、部位Bに対するsiRNA発現ベクターでは最も抑制活性が高く14%まで低下させた。部位A、部位Cおよび部位Dに対するsiRNA発現ベクターではそれぞれ44%、38% および36%まで低下させた。なお、部位0に対するsiRNA発現ベクターでは、二つのコントロール発現ベクター、Hyg-U6siRNAおよびpU6と同様に抑制活性は0%であった。

上記標的部位による発現抑制活性の違いが、標的部位の違いのみに由来するのか、それとも各siRNAの転写効率の違いによるかを検討した。この検討を行うために、上記センス、アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドをそれぞれ合成した。このsiRNAオリゴヌクレオチドの配列は以下の通りである。

ホタルルシフェラーゼ0部位センス鎖：5'-GCUAUGAAACGAUAUGGGCUU-3'（配列番号：11）、
 0部位アンチセンス鎖：5'-GCCCAUAUCGUUUCUAGCUU-3'（配列番号：12）、A部位センス鎖：5'-GUUCGUCACAUCUCAUCUACUU-3'（配列番号：13）、
 A部位アンチセンス鎖：5'-GUAGAUGAGAUGUGACGAAUU-3'（配列番号：14）、B部位センス鎖：5'-GUGCGCUGCUGGUGCCAACUU-3'（配列番号：15）、

B部位アンチセンス鎖：5'-GUUGGCACCAGCAGCGCACUU-3'（配列番号：16）、C部位センス鎖：5'-AUGUACACGUUCGUCACAUUU-3'（配列番号：17）、C部位センス鎖5'-AUGUGACGAACGUGUACAUUU-3'（配列番号：18）、コントロールのウミシイタケルシフェラーゼ（センス鎖塩基突出）：5'-GUAGCGCGGUGUAUUAUACUU-3'（配列番号：19）、（アンチセンス鎖塩基突出）5'-GUAUAUACACCGCGCUACUU-3'（配列番号：20）。

上記RNAオリゴヌクレオチドの合成は、RNA合成機Model 394 (Applied Biosystems)を用いた。合成RNAは、脱保護され、アクリルアミドゲルを変性させることにより精製した。ゲルからの溶出後、各RNAはNAP-10カラム(Pharmacia)を用い、RNA分解酵素を含まない水で溶出して脱塩化した。その後、真空下で乾燥させ、アニーリングバッファー（リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）pH 6.8, 2 mM MgCl₂）中に再懸濁した。次いでRNAオリゴヌクレオチドをアニーリングさせた。アニーリングは10 μM濃度のRNAを準備し、これを95℃、1分間インキュベーションし、その後、70℃に冷却し、その後ゆっくり4℃まで2時間かけて冷却することにより、実施した。これらsiRNAオリゴヌクレオチドを上記と同様にHeLaS3細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した（図5b）。

各標的部位に対するsiRNAオリゴヌクレオチドによるルシフェラーゼ発現の抑制プロファイルは、部位0に対するsiRNAオリゴヌクレオチドが僅かな抑制活性を示した以外は、オリゴヌクレオチド導入濃度1 nM、0.1 nMにおいて、siRNA発現ベクターによるルシフェラーゼ発現抑制プロファイルと同様のパターンを示した。この結果より、上記標的部位による発現抑制活性の差異は、各siRNAの発現効率の違いによるものではなく、標的部位の違い、たとえば、標的部位の二次構造やRNA結合タンパク質の存在に依存することが示された。

〔実施例4〕 siRNAの3'末端の突出塩基の長さによる影響

U6プロモータにより生成されるsiRNAは、3'末端に4つのウリジン塩基の突出を有する。一方、Elbashirらはショウジョウバエのin vitro実験において、siRNAにおける3'末端の突出は2, 3塩基よりも長い場合には発現抑制効率が低下することを報告している(Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200 (2001))。そこで、上記siRNAの3'末端における4塩基の突出が、siRNAによるRNAiの誘導効率に影響を与えるかを検討した。上記ウミシイタケルシフェラーゼ転写産物上の同一標的部位に対するsiRNAオリゴヌクレオチドにおいて、3'末端の突出のウリジン塩基の数を2塩基, 3塩基あるいは4塩基としたものを上記実施例3と同様に合成・調製した。これらウミシイタケルシフェラーゼに対するsiRNAオリゴヌクレオチドとインターナルコントロールのホタルルシフェラーゼ発現ベクターを様々な濃度でHeLaS3細胞に上記リポフェクション法により導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した(図6AC)。

上記インターナルコントロールのみでは、ウミシイタケルシフェラーゼの発現は抑制されないが、上記オリゴヌクレオチドをコトランスフェクションした群では、導入濃度に依存して、ウミシイタケルシフェラーゼの発現が抑制された。また、この発現抑制活性は、オリゴヌクレオチドの3'末端における2~4塩基の突出長さの違いにより、発現抑制活性に大きな差異は見られなかった。そのため、U6により生成される3'末端に4塩基の突出を有するsiRNAでも、2塩基、3塩基突出のsiRNAと同様に標的遺伝子の発現を効果的に抑制し得ることが示された。

[実施例5] 複数遺伝子の同時抑制

二つの異なる遺伝子を同時に発現させて異なる標的遺伝子の発現を同時に抑制し得るか否かを検討した。ホタルルシフェラーゼおよびウミシイタケルシフェラーゼに対する二つのsiRNA発現カセットを備えたプラスミドを構築し、コト

ランスフェクションした。

ホタルルシフェラーゼ発現ベクター (30 ng)、ウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター (30 ng) を両ルシフェラーゼ転写産物に対するsiRNAを発現するベクター (300ng) をインターナルコントロールである β -ガラクトシダーゼ発現ベクター (100 ng) とともにHeLaS3細胞にコトランスフェクションした。なお、コントロールとして、ホタルルシフェラーゼ転写産物またはウミシイタケルシフェラーゼ転写産物のいずれか一方に対するsiRNAを発現するベクターを用いて同様に行った。

図6Bに示す通り、両ルシフェラーゼに対するsiRNA発現ベクター (U6i-Firefly/Renilla) のトランスフェクションにより、ホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼの発現を同時に、いずれか一方のルシフェラーゼに対するsiRNA発現ベクター (U6i-Renilla、U6i-Firefly) をトランスフェクションした場合と同じレベルまで、それぞれのルシフェラーゼの発現活性を低下させた。

上記の通り、同一のプラスミド上に複数のsiRNA発現カセットを配置し、これら複数のsiRNAを同時に発現させることにより、相互のプロモータ間で干渉を生じさせることなく、対応する標的遺伝子の発現を抑制し得ることが示された。

〔実施例6〕 内因性の遺伝子の発現抑制

上記実施例ではすべて外来から導入した遺伝子の発現を抑制したが、siRNA発現ベクターにより内因性遺伝子の発現を抑制し得るかを検討した。

本実施例においては、標的となる内因性遺伝子に β カテニンを選択した。この β カテニンは、裏打ちタンパク質であり、カドヘリンに起因した細胞間接着に関する因子として、また重要なガン遺伝子として知られている (Peifer, M. & Polakis, P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. Science 287, 1606–1609 (2000))。

β カテニンを発現しているSW480細胞に β カテニンに対するsiRNA発現カセッ

トを備えたEGFP発現プラスミド(pEGFP/ibeta-catenin)を導入した。コントロールとして、 β カテニンに対するsiRNA発現カセットを保持しないEGFP発現プラスミド(pEGFP)を同様の60%コンフルエントの細胞に導入した。この細胞へのプラスミドの導入は、スライドガラスに細胞をのせ、Effectene (Qiagen) またはFugene 6 (Roche Molecular Biochemicals)の試薬を用いて導入した。導入48時間後に、細胞を4% パラホルムアルデヒド含有PBSで20分間固定処理を行った。その後、0.1% トライトンX100で浸透操作を行い、抗 β カテニン抗体(UBI社)およびCy3ラベルした二次抗体を用いて染色した。染色後の細胞の蛍光を共焦点顕微鏡で解析した(図7)。

pEGFP/ibeta-cateninを保持した緑色の蛍光を発する細胞では、プラスミド非導入細胞と比べて、 β カテニンの発現レベルが実質的に低いことが示された。また、pEGFPを導入し、緑色の蛍光を発する細胞では、 β カテニンの発現レベルは、プラスミド非導入細胞と比べて差異は見られなかった。

〔実施例7〕 タンデム型siRNA発現ベクターおよびステム型siRNA発現ベクターにおける発現抑制効果の比較解析

次に、センスおよびアンチセンスRNAをコードするDNAがそれぞれタンデムに位置する構造を有するsiRNA発現ベクター(pU6tandem19)、およびステムループ形のRNA分子を発現し得るsiRNA発現ベクター(pU6stem19)を用いて、それぞれのベクターにおける発現抑制効果を検討した。上記発現ベクターから発現されるsiRNAを、それぞれタンデム型siRNA、ステム型siRNAと記載する。pU6stem19において転写されるステムの配列は5'-GTGCGCTGCTGGTGCCAACgugugcuguccGTTGGCACCAGCAGCGCAC-3' (配列番号: 21) である。発現抑制活性の定量は、上述の実施例に記載されたルシフェラーゼ解析によって行った。

解析結果を図8に示す。タンデム型siRNAおよびステム型siRNAのいずれにおいても、ルシフェラーゼの活性を濃度依存的に低下させた。この結果から、タ

ンデム型siRNAおよびステム型siRNAの発現システムは、いずれも効果的に標的遺伝子の発現を抑制することが分った。

〔実施例8〕 種々のsiRNA発現ベクターにおける発現抑制効果

次に、各種プロモータを備えたsiRNA発現ベクターを用いて、発現抑制効果の検討を行った。siRNA発現ベクターは以下のものを使用し、上述の実施例と同様の条件でルシフェラーゼ解析を行った。

- ・ タンデム型siRNAをヒトU6プロモータによって発現させるベクター (pU6 tandem 19)
- ・ タンデム型siRNAをヒト5S rRNAプロモータによって発現させるベクター (p5S tandem 19)
- ・ タンデム型siRNAをヒトH1プロモータによって発現させるベクター (pH1 tandem 19)
- ・ ステム型siRNAをヒトH1プロモーターによって発現させるベクター (pH1 stem 19)

図9で示すように、使用した各種発現ベクターにおいて、ルシフェラーゼの抑制活性が見られた。すなわち、siRNA発現ベクターに使用可能なプロモータとしては、ある特定のプロモータに限定されず、ヒトU6プロモーター、ヒト5S rRNAプロモータ、ヒトH1プロモーター等の種々のプロモータを利用できることが示された。

〔実施例9〕 CMVプロモータまたはtRNAプロモータを備えたsiRNA発現ベクターにおける発現抑制効果

次にサイトメガロウイルス由来プロモータ (CMVプロモータ) もしくはtRNAプロモータとトリミングリボザイムを備えたsiRNA発現ベクター (それぞれpCMV-TRz、ptRNA-TRz) について、発現抑制効果の検討を行った。tRNAプロモータからの

4 3

転写物は、5'側にtRNA分子が付加された構造を有する。なお、トリミングリボザイムの作用により、siRNAの形成に必要な3'側の余分なRNA分子は切除される。

図10で示すように、CMVプロモータまたはtRNAプロモータを備えたsiRNA発現ベクターいずれにおいても、ルシフェラーゼ活性の低下が見られた。

よって本発明のsiRNA発現ベクターにおけるプロモータとして、CMVプロモータまたはtRNAプロモータを好適に使用することが可能であることが示された。また、発現ベクターの転写物の5'側にtRNA等の分子が結合したものであっても、標的遺伝子の発現抑制効果を有することが明らかとなった。

〔実施例10〕 ミスマッチまたはバルジを含むsiRNA二本鎖におけるRNAiの誘導

次に、siRNA二本鎖中の塩基対のミスマッチまたはバルジの存在が、RNAi効果に及ぼす影響について検討を行った。次のようなRNA配列を実験に使用し、上述の実施例と同様の条件でルシフェラーゼ解析を行った。

- ・対照となるRNA配列：5'-GUGCGCUGCUGGUGCCAACCCgugugcuguccGGGUUGGCACCAGCAGCGCAC-3'（配列番号：22）
- ・ミスマッチを含むRNA配列：5'-GUGCGCUGuUGGUGuCAACCCgugugcuguccGGGUUGGCAACAGCAGCGCAC-3'（配列番号：23）
- ・バルジを含むRNA配列：5'-GUGCGCUGCUGGUGCuCAACCCgugugcuguccGGGUUGGCACCAACAGCGCAC-3'（配列番号：24）

図11で示すように、使用した各種発現ベクターにおいて、ルシフェラーゼの抑制活性が見られた。また、siRNA二本鎖中のミスマッチまたはバルジの有無によって、発現抑制活性には大きな差異は見られなかった。

さらに、ミスマッチまたはバルジを含む種々のsiRNAにおけるRNAi効果を検討した。siRNAの片鎖をコードするDNA配列、および該配列におけるRNAi効果（ル

シフェラーゼ活性)を図32に示す。

以上のことから、siRNA二本鎖中にミスマッチまたはバルジを含むものであっても、標的遺伝子の発現を効果的に抑制し得ることが示された。つまり、siRNAの二本鎖を構成するそれぞれの鎖は、互いに完全に相補的なものに限定されない。

〔実施例11〕 テトラサイクリンで誘導可能なプロモータを有するsiRNA発現ベクターによるRNAiの誘導

テトラサイクリンによってRNAプロモータからの転写活性を制御できるシステム(TetON系)が知られている(Ohkawa, J. & Taira, K. Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter. Hum Gene Ther. 11; 577-585 (2000))。このシステムに用いられるヒトU6プロモータには、テトラサイクリン耐性トランスポゾンのテトラサイクリンオペレータ配列が挿入されている(図12)。この配列にテトラサイクリンリプレッサータンパク質が結合すると、プロモータ活性が抑制される。このプロモータからの転写制御を受ける発現ベクターは、テトラサイクリンリプレッサータンパク質を発現する細胞(例えば、HeLa細胞)中において、転写活性が抑制された状態にある。これは細胞中のテトラサイクリンリプレッサータンパク質が、ヒトU6プロモータへ結合し、転写活性を抑制するためと考えられる。この細胞へテトラサイクリン(またはテトラサイクリン誘導体)を添加すると、テトラサイクリンリプレッサータンパク質とテトラサイクリンが結合し、テトラサイクリンリプレッサータンパク質がU6プロモータから遊離するため、その結果、転写が活性化される。

本発明者らはテトラサイクリン耐性トランスポゾンのテトラサイクリンオペレータ配列が挿入されたヒトU6プロモータを有するsiRNA発現ベクターを構築し、TetON系を利用して、siRNA発現ベクターにおける遺伝子抑制効果について検

討した。上述の実施例と同様の条件でルシフェラーゼ解析を行った。

図13で示すように、テトラサイクリン耐性トランスポゾンのテトラサイクリンオペレータ配列が挿入されたヒトU6プロモータを備えたsiRNA発現ベクターは、テトラサイクリンの添加により、ルシフェラーゼ活性を低下させた。一方、テトラサイクリンオペレータ配列を含まないsiRNA発現ベクターは、テトラサイクリンの添加の有無にかかわらず、ルシフェラーゼ活性を低下させた。このことから、siRNAの発現を誘導させるプロモータとして、テトラサイクリンで誘導可能な上記のU6プロモータが好適に利用できることが示された。

〔実施例12〕 RNAセルフプロセッシングによるsiRNAの生成

siRNA発現ベクターにおいて、polIII系のプロモータを用いた場合、ある程度の長さを有するRNAが転写される。そのため、polIII系のプロモータを用いた場合には、例えば、このRNAをセルフプロセッシングにより切断し、アンチセンスRNAまたはセンスRNAを生成させる必要がある。そこで、アンチセンスコードDNAあるいはセンスコードDNAを有し、その5'端、3'端にリボザイムが認識するRNA配列をコードした領域（認識配列コード領域）がそれぞれ備えられ、さらに、この認識配列コード領域の外側にはそれぞれ隣接するように認識配列を切断する5'端、3'端切断用リボザイムがコードされた領域がそれぞれ備えられたRNA生成ユニット（図2）を用いて、実際にRNAのセルフプロセッシングが起こるかどうかを検討した。図14、15にRNAセルフプロセッシングの様式を模式的に示す。上記のユニットからの転写物をゲル電気泳動に供することにより解析を行った。

ゲル電気泳動の結果を図16に示す。図16の泳動バンドの横に、各バンドに対応する、想定されるRNA分子の構造を示した。RNAセルフプロセッシングによって生成されたものと考えられる、種々の長さのRNAに対応したバンドが観察された。また、21ntの長さのsiRNAのバンドが見られた。このことから、図2で

示されるようなRNA生成ユニットを用いれば、RNAのセルフプロセッシングによる切断効果によって、siRNAを効率的に生成させることが可能であることが示された。

〔実施例13〕 EGFP mRNAを標的としたsiRNAライブラリー発現システムの作製

EGFP mRNAのランダムな部位を標的としたsiRNAライブラリー発現システムの作製を行った。作製概要を図19～図23に示す。

(a) 約20 - 25bp EGFP cDNA断片の調製

図19-①で示したsiRNA発現ライブラリー作製の出発材料となる「脱リン酸化平滑化末端をもつランダムな約20 - 25bpのEGFP cDNA断片」を以下のように調製した。図24にその概要を示した。

pEGFP-N1からEGFPをコードする部分をPCR増幅し、この増幅産物をDNaseI処理することでランダムな約20 - 25bpのEGFP cDNA断片を得た。この断片を大量調製するため、得られた断片をKlenow Fragmentにより平滑末端化し、サブクローニングした。サブクローニングに用いたベクターpSwaIはpUC18を改変することで構築した。このベクターは、クローニング部位（SwaI認識部位）の前後に制限酵素BseRIの認識部位を設け、BseRIによりインサートDNAを切り出せるように構成されている。

サブクローニングされた約20 - 25bpのEGFP cDNA断片をBseRIで切り出した。BseRI切断後は2塩基余分な粘着末端が形成されるため、これをT4 DNA Polymeraseにより平滑化した。CIAP処理により末端の脱リン酸化を行った。以上の操作によって脱リン酸化平滑化末端をもつランダムな約20 - 25bpのEGFP cDNA断片を大量に得た。

(b) EGFP mRNAを標的としたsiRNAのセンスコードDNAとアンチセンスコードDNAをもつDNA断片の合成

(a)で調製した「脱リン酸化平滑化末端をもつ約20 - 25bpのEGFP cDNA断片」の両端に5' -リン酸化ヘアピン型DNAリンカー1をライゲーションした(図19-②)。このヘアピン型リンカーには、II s型制限酵素BspMIとBsgIの認識部位が設けられており、連結部位またはその近傍で切断することが可能なように構成されている。つぎに、この約20 - 25bp cDNA断片とヘアピン型リンカーの連結産物の連結部位に存在するnick部位にBstDNA Polymeraseを作用させ、鎖置換反応を行った。これにより約20 - 25bpのEGFP cDNA断片とヘアピン型リンカーが1対1で連結したDNA産物を合成した(図20-③)。つぎにこの産物の平滑末端側(EGFP cDNA断片側)に新たな5' 端リン酸化DNAリンカー2をライゲーションした(図20-④)。このDNAリンカーの片端はPol III型プロモータからの転写の終結となるAAAAA/TTTTT配列が存在する。もう片端には制限酵素AscIの認識部位が存在する。AAAAA/TTTTT側のみが5' リン酸化されている。

このEGFP cDNA、リンカー1、リンカー2の連結産物に再びBst DNA Polymeraseを作用させ、連結部位に存在するnick部位から鎖置換反応を行った(図21-⑤)。これによりEGFP mRNAを標的としたsiRNAのセンスコードDNAとアンチセンスコードDNAが直列に存在するDNA断片を合成した。センスコードDNAとアンチセンスコードDNAの間にはII s型制限酵素BspMIとBsgIの認識部位が存在する。

(c) EGFP mRNAを標的としたsiRNAのセンスコードDNAとアンチセンスコードDNAをもつDNA断片のクローニング

(b)で合成したEGFP mRNAを標的としたsiRNAのセンスコードDNAとアンチセンスコードDNAをもつDNA断片をAscI切断し、粘着末端、平滑末端をもつDNA断片に調製した(図21-⑥)。つぎにこの断片をクローニングするためのヒトU6プロモーターを保持したクローニングベクターを構築した(図25)。プロモータの下流には、制限酵素BspMI、BseRI、AscIの認識部位が存在し、BspMIでプロモータの直下を切断、Klenowで切断部位を平滑化後、AscIで切断し、粘着末端、平滑末端をもったクローニングベクターを調製した。このベクターにEGFP mRNA

を標的としたsiRNAのセンスコードDNAとアンチセンスコードDNAをもつ平滑末端、粘着末端のDNA断片を連結し、クローニングした (Anti-EGFP U6型 siRNA発現プレ・ライブラリー) (図22-⑦)。

またヒト tRNA-valプロモータを保持したクローニングベクターも構築した (図25)。ヒト tRNA-valプロモータの下流にも同様に制限酵素BspMI、BseRI、AscIの認識部位が存在する。クローニングベクター調製はBspMIの代わりにBseRI切断でも可能であり、このベクターの場合はBseRIでプロモータの直下を切断し、T4 DNA polymeraseで切断部位を平滑化後、AscIで切断、同様にクローニングを行った (Anti-EGFP tRNA型 siRNA発現プレ・ライブラリー)。

siRNA発現プレ・ライブラリープラスミドDNAをsiRNAのセンスコードDNAとアンチセンスコードDNAの間のBspMIで切断し (図22-⑧)、Klenowで切断断片を平滑化し自己連結させることで、プロモータ、アンチセンスDNA、センスDNA、TTTTTが一行につながったAnti-EGFP siRNA発現ライブラリーを構築した (図22-⑨)。シーケンス解析の結果、目的の産物ができていることを確認した。表1にAnti-EGFP U6型 siRNA発現ライブラリーのsiRNAコードDNAのシーケンス例を示す。

表1

5' - U6プロモーター (アンチセンスコードDNA) (Loopなし) (センスコードDNA) TTTTT AscI - 3'

Clo ne. No	アンチセンスコードDNA	Loop	センスコードDNA
1	GFP 24	なし	GFP 24
	CCCGTGCCCTGGCCCACCGTCGTG (配列番号: 39)		CACGAGGGTGGGCCAGGGCACGG G (配列番号: 40)
2	GFP 24	なし	GFP 24
	ACCAGGATGGGCACCAACCCGGTG (配列番号: 41)		CACCGGGGTGGTCCCATCCTGG T (配列番号: 42)

表1中、アンチセンスコード、センスコードはEGFP mRNAのそれと逆転する場合があるが、RNAi誘導には問題はない。

また、プレ・ライブラリープラスミドDNAを先にBsgI切断、その後BspMI切断し（図23-⑧-2）、T4 DNA polymeraseで切断部位を平滑化後自己連結を行うことで、アンチセンスDNAとセンスDNAの間にsiRNAのLoop配列となるTTCGが存在するsiRNA発現ライブラリーを構築した。ヘアピン型DNAリンカー1の配列、制限酵素の種類、位置を変更することで、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAの間のLoop配列を自由に変更したり、プロモータや選択マーカ等断片を加えたりすることが可能である。

〔実施例14〕 EGFP mRNAを標的としたsiRNAライブラリー発現システムの評価

上記Anti-EGFP U6型 siRNA発現ライブラリー（1 μ g）、pEGFP-N1（0.01 μ g）をヒトHeLaS3細胞にリポフェクション法（リポフェクトアミン2000）コトランスフェクションした。37℃で48時間静置した後、共焦点顕微鏡で観察した。なお、コントロール実験として、siRNAライブラリー発現システムに代えてpUC18（1 μ g）を用いて同様の操作を行った。

結果、図26に示すようにpEGFP-N1による緑色の蛍光を発する細胞は、コントロール（pUC18導入群）に比べ、Anti-EGFP U6型 siRNAライブラリー発現システム導入群で減少しており、FACS解析の結果細胞の蛍光発光強度の低下もみられた（図27）。このことより、Anti-EGFP U6型 siRNAライブラリー発現システムの導入により、RNAiが誘導され、標的遺伝子の発現抑制が示された。

Anti-EGFP U6型 siRNAライブラリー発現システムの中にRNAiを誘導するクローンが存在し、それらにより標的遺伝子の発現抑制されたと期待される。

また、Anti-EGFP tRNA型siRNAライブラリー発現システムにおいても同様の結果が示された（図26、図27）。

〔実施例15〕 siRNA発現アデノウイルスベクターおよびHIVベクターによる発現抑制効果

評価用マーカー遺伝子としては、ルシフェラーゼ (pGL3-Control: プロメガ社) を用いた。SiRNAは、ヒトU6プロモータによりタンデム型で発現させた。標的とした配列はsiteB: 5'-GTGCGCTGCTGGTGCCAAC-3' (配列番号: 43) とした。アデノウイルスベクターは水口らの方法 (日本臨床, 58, 1544-1553 (2000)) に従い調製を行った。

1) RNAi発現カセットのシャトルプラスミドへの組み込み

クロンテック社から公開されているPShuttleのシークエンスでは、HincII siteが3箇所あるが、シークエンスの結果、実際には、I-CeuI、PI-SceI内の1箇所のみしか存在しないことを確認した。

発現プラスミド (pU6i-FGLB) をHindIIIで切断後、Klenow処理で末端を平滑化した。次にEcoRIで切断して、発現カセット (約600bp) をEcoRI、HincII処理したシャトルベクター (pShuttle) に組み込み、pU6i-FGLB/Shuttleを構築した。

2) 発現カセットのPSuttleからのAdベクタープラスミドへの組み込み、およびAdベクターの作製

RGDファイバーを持つAdベクタープラスミド (pAdHM15-RGD) にRNAi発現カセットを水口らの方法に従って、組み込み、pU6-FGLB/RGDを構築した。

コントロールとして、インサートを持たないpAdHM15-RGDとpU6-FGLB/RGDをPacI消化後、TransIT293 (TaKaRa社製) を用いてリポフェクションした。CPEの出た細胞から、水口らの方法に従って、Adベクターを調製した。

塩化セシウム超遠心法で調製した、Adベクターを1%BSA入りのPBS (-) で1晩透析してAdベクターを精製した。精製したAdベクターのタイターはAdeno-X Rapid Titer Kit (Clontech社製) を用いて、測定した。測定した各Adベクターのタイ

ターは以下の通りだった。

RGD/Ad (コントロール) : 6.76×10^{10} ifu/ml

U6-FGLB/Ad : 5.27×10^{10} ifu/ml

3) HeLa-S3細胞の調製

HeLa-S3細胞を 5×10^5 cells/mlとなるように調製し、1ml/wellずつ6well plateに播いた。次に、各種Ad vectorをMoi 1, 10, 20, 50, 100となるように各wellに添加した。24時間後のリポフェクション前に培地を1.5ml加えた。

4) ルシフェラーゼプラスミドのリポフェクション

Adをトランスダクションして24時間後に、1ウェル当たり以下の組成でルシフェラーゼ発現プラスミドをリポフェクションした。

Opti-MEMを250ul入れたTubeAにpGL3-Controlを0.02ug、pRL-Tkを0.1ug、pUC19を1.0ug加えた。Opti-MEMを250ul入れたTubeBにLipofectAmine2000 (Invitrogen社製)を5ul加え、室温で5分間静置した後、全量をTubeAに加えてよく混ぜ合わせた。室温で20分間静置した後、全量を各ウェルに加え、37℃で48時間培養した。

5) ルシフェラーゼアッセイ (Luciferase assay)

ルシフェラーゼアッセイはプロメガ社のDual-Luciferase Reporter Assay Systemを用いて測定した。

リポフェクション後48時間培養したプレートの各ウェルを500ulのPBS (-)で1回洗浄した。PBS (-)を除去した後、1×PLBを各ウェル500ul ずつ加え、室温で15分間、時々プレートを震盪しながら細胞を溶解した。細胞溶解液を1.5ml tubeに移し、14000rpmで1分間遠心した後、上清を新しい1.5ml tubeに移した (PLB Lysate)。

ルシフェラーゼ活性の測定はベルトールド社製のAutoLumatPLUS LB953を用いて測定した。10ulのPLB Lysateを用いて、FireFly Luciferase (ホタルルシフェラーゼ) とRenilla Luciferase (ウミシイタケルシフェラーゼ) を各10秒間

測光した。ホタルルシフェラーゼ／ウミシイタケルシフェラーゼのRLU値の比をもとに、コントロールのRGD/Adを導入した細胞の値を100%として、それぞれのRNAi発現Adのルシフェラーゼ抑制効果を表した（図29）。

同様に、HIVベクターについても発現抑制効果を検討した結果、図30で示すように、RNAi発現HIVのルシフェラーゼ抑制効果が見られた。

siRNA発現HIVベクターの作製はsiRNA発現アデノウイルスベクターとほぼ同様に、HIVシャトルベクターにFireFly luciferaseに対するsiRNA発現カセットを挿入することにより、作製した。標的とした配列はsiteB：5'-GTGCGCTGCTGGTGCCAAC-3'（配列番号：43）であり、プロモータはU6を用い、発現されるRNAは5'-GUGCGCUGCUGGUGCCAACCCgugugcuguccGGGUUGGCACCAGCAGCGCAC-3'（配列番号：22）、5'-GUGCGCUGuUGGUGuCAACCCgugugcuguccGGGUUGGCACCAGCAGCGCAC-3'（配列番号：23）、5'-GUGCGuUGuUGGUGuuAAuCCgugugcuguccGGGUUGGCACCAGCAGCGCAC-3'（配列番号：57）のステムループタイプである。siRNA発現シャトルプラスミドを293T細胞に導入し、ウイルスパーティクルを常法により回収、濃縮し、293細胞に5～8MOIでトランスフェクションした。その後アデノウイルスの場合と同様にルシフェラーゼ活性によりRNAi効果を調べた。

[実施例16] siRNA発現ダンベル型ベクターにおける発現抑制効果

次に、siRNA発現ダンベル型ベクターを用いて、発現抑制効果の検討を行った。siRNA発現ベクターは以下のものを使用し、上述の実施例と同様の条件でルシフェラーゼ解析を行った。

- ・ステム型siRNAをヒトU6プロモータによって発現させるベクター(pU6stem)
- ・siRNAを発現させるダンベル型のベクター(Dumbbell)

図31で示すように、siRNA発現ダンベル型ベクターにおいて、ルシフェラーゼの抑制活性が見られた。すなわち、siRNA発現システムをダンベル型ベクターへ保持させることにより、効率的な発現抑制効果が見られることが示された。

産業上の利用の可能性

上記の通り、細胞内siRNA発現システムを用いることにより、標的遺伝子の発現を抑制することができた。また、一つのベクターに複数の標的遺伝子に対するsiRNA発現システムを保持させ、細胞に導入した結果、複数の標的遺伝子の発現を抑制することもできた。このような細胞内siRNA発現システムを用いることにより、siRNAが細胞内で供給されるため、安定的かつ長期にわたるsiRNAの発現、すなわち、標的遺伝子の抑制を行うことも可能となる。また、ウイルスベクターなどを用いることにより細胞内への導入効率も向上させることができるため、より確実に哺乳動物細胞においてRNAiを誘導させることが可能となる。よって、本システムは、RNAiを利用した遺伝子治療、ノックダウン動物の創生に寄与し得る。

また、本システムを機能遺伝子の探索方法に活用し得るように、siRNAライブラリー発現システム、および該システムの集合体が提供された。これらシステム等を用いることにより、機能遺伝子の探索を簡易かつ効率的なものとすることができる。そのため、本siRNAライブラリー発現システム等は、機能遺伝子の加速的な解明に寄与し得る。

請求の範囲

1. 細胞内でsi(短鎖干渉)RNAを発現させるシステムであって、
標的遺伝子mRNAのいずれかの領域に対するアンチセンスRNAをコードしたアンチセンスコードDNAと、
前記標的遺伝子mRNAのいずれかの領域のセンスRNAをコードしたセンスコードDNAと、
前記アンチセンスコードDNAおよび前記センスコードDNAより前記アンチセンスRNAおよび前記センスRNAを発現させる一つ以上のプロモータとを備えた、siRNA発現システム。
2. 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至49塩基対である、請求項1記載のsiRNA発現システム。
3. 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至35塩基対である、請求項1記載のsiRNA発現システム。
4. 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至30塩基対である、請求項1記載のsiRNA発現システム。
5. siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中にミスマッチまたはバルジを含む、請求項1記載のsiRNA発現システム。
6. ミスマッチの一方の塩基がグアニンであり、他方がウラシルである、請求項5記載のsiRNA発現システム。
7. 1乃至7個のミスマッチを含む、請求項5記載のsiRNA発現システム。
8. 1乃至7個のバルジを含む、請求項5記載のsiRNA発現システム。
9. 1乃至7個のバルジおよびミスマッチの両方を含む、請求項5記載のsiRNA発現システム。
10. プロモータがpolIII系またはpolIII系プロモータである、請求項1乃至9のいずれかに記載のsiRNA発現システム。

1 1. polIIIプロモータがU6プロモータである、請求項1乃至1 0のいずれかに記載のsiRNA発現システム。

1 2. プロモータが誘導可能なものである、請求項1乃至1 1のいずれかに記載のsiRNA発現システム。

1 3. プロモータがアンチセンスコードDNAと、センスコードDNAの上流にそれぞれ備えられている請求項1乃至1 2のいずれかに記載のsiRNA発現システム。

1 4. 以下の（a）～（c）のいずれかのようにloxP配列が備えられた、発現制御可能な請求項1乃至1 3のいずれかに記載のsiRNA発現システム。

（a）プロモータ内のDSEとPSEとを距離をあけて備え、その間、DSEの近傍とPSEの近傍とにそれぞれloxP配列を備える

（b）プロモータ活性を保持し得るように配置されたDSEとPSEとの間にloxPを備え、DSEの上流またはPSEの下流にもう一つのloxPを備える

（c）アンチセンスコードDNAまたはセンスコードDNAを挟むように二つのloxPを備える

1 5. アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとが同一のベクター分子上にまたは別のベクターDNA分子にそれぞれ保持された、請求項1乃至1 4のいずれかに記載のsiRNA発現システム。

1 6. プロモータが、アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAがリンカーを挟んで逆向きに連結されたユニットの片側に備えられている請求項1乃至1 3のいずれかに記載のsiRNA発現システム。

1 7. 以下の（a）～（d）のいずれかのようにloxP配列が備えられた、発現制御可能な請求項1 6に記載のsiRNA発現システム。

（a）プロモータ内のDSEとPSEとを距離をあけて備え、その間、DSEの近傍とPSEの近傍とにそれぞれloxP配列を備える

（b）プロモータ活性を保持し得るように配置されたDSEとPSEとの間にloxPを

備え、DSEの上流またはPSEの下流にもう一つのloxPを備える

(c) アンチセンスコードDNAまたはセンスコードDNAを挟むように二つのloxPを備える

(d) リンカーにストップ配列を備え、該配列を挟むように二つのloxPを備える

18. アンチセンスコードDNAとセンスコードDNAとがベクター分子上に保持された、請求項16または17に記載のsiRNA発現システム。

19. ベクターがプラスミドベクターである、請求項15または18に記載のsiRNA発現システム。

20. ベクターがウイルスベクターである、請求項15または18に記載のsiRNA発現システム。

21. ベクターがダンベル型DNAベクターである、請求項15または18に記載のsiRNA発現システム。

22. 請求項1乃至21のいずれかに記載のsiRNA発現システムを保持した細胞。

23. 細胞が哺乳動物細胞である、請求項22記載の細胞。

24. 請求項1乃至21のいずれかに記載のsiRNA発現システムを保持した生物個体。

25. 請求項1乃至21のいずれかに記載のsiRNA発現システムを含む組成物。

26. 医薬組成物である、請求項25記載の組成物。

27. 標的遺伝子の発現が抑制された細胞を生産する方法であって、

請求項1乃至21のいずれかに記載のsiRNA発現システムを細胞に導入する工程、および前記siRNA発現システムが導入された細胞を選択する工程、を含む、生産方法。

28. 細胞内でsiRNAライブラリーを発現させるシステムであって、

siRNAの鎖長分の任意配列からなる二本鎖のsiRNAコードDNAと、

前記siRNAコードDNAを挟むように対向して、前記二本鎖のそれぞれの鎖から互いに相補するRNAを発現させ得る二つのプロモータと、が備えられた、siRNAライブラリー発現システム。

29. 細胞内でsiRNAライブラリーを発現させるシステムであって、

アンチセンスコードDNAと該アンチセンスコードDNAと相補的なセンスコードDNAとをリンカーを挟んで逆向きに接続したステム型siRNA生成ユニットと、前記ステム型siRNA生成ユニットの片側に、ステム型siRNAを発現させ得るプロモータと、が備えられた、siRNAライブラリー発現システム。

30. 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至49塩基対である、請求項28または29記載のsiRNAライブラリー発現システム。

31. 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至35塩基対である、請求項28または29記載のsiRNAライブラリー発現システム。

32. 発現されるsiRNAが転写され最終的に15乃至30塩基対である、請求項28または29記載のsiRNAライブラリー発現システム。

33. siRNAにおけるRNA同士が対合する二重鎖RNA領域中にミスマッチまたはバルジを含む、請求項28乃至32のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム。

34. プロモータがpolIII系またはpolIII系プロモータである、請求項28乃至33のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム。

35. プロモータが誘導可能なものである、請求項28乃至33のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム。

36. 発現されるsiRNAが、ランダムなRNA鎖から構成される、請求項28乃至33のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム。

37. コーディング領域及び／またはノンコーディング領域を含む個々の遺伝子配列に対する、個々のsiRNA発現ベクターを個々に作成し、それらをすべて

集めることによって構成される、請求項28乃至33に記載のsiRNAライブラリー発現システム。

38. 発現されるsiRNAが、任意のcDNAまたはゲノムDNAのsiRNA鎖長分の部分断片DNAによってコードされるRNA鎖から構成される、請求項28乃至33のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システム。

39. 請求項28乃至38のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システムの集合体であって、

集合内のそれぞれのシステムより異なるsiRNAが発現される、siRNAライブラリー発現システム集合体。

40. 請求項28乃至38のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システムまたは請求項39記載のsiRNAライブラリー発現システム集合体を細胞に導入する工程、

前記siRNAライブラリー発現システムまたは前記集合体が導入された細胞を選択する工程、

選択された細胞の表現型を解析する工程、を含む機能遺伝子探索方法。

41. 表現型解析により表現型が変化していた細胞中のsiRNAコードDNAの配列に基づいて機能遺伝子をスクリーニングする工程をさらに含む、請求項40記載の機能遺伝子探索方法。

42. 請求項28乃至38のいずれかに記載のsiRNAライブラリー発現システムまたは請求項39記載のsiRNAライブラリー発現システム集合体を細胞に導入する工程、

前記siRNAライブラリー発現システムまたは前記集合体が導入された細胞において特定の遺伝子またはタンパク質の発現量を測定する工程、を含む高活性siRNA選択方法。

図 1

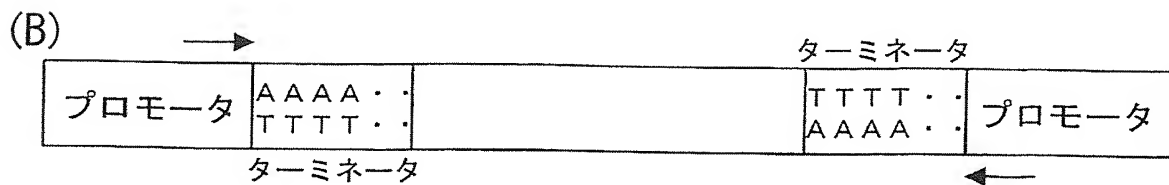
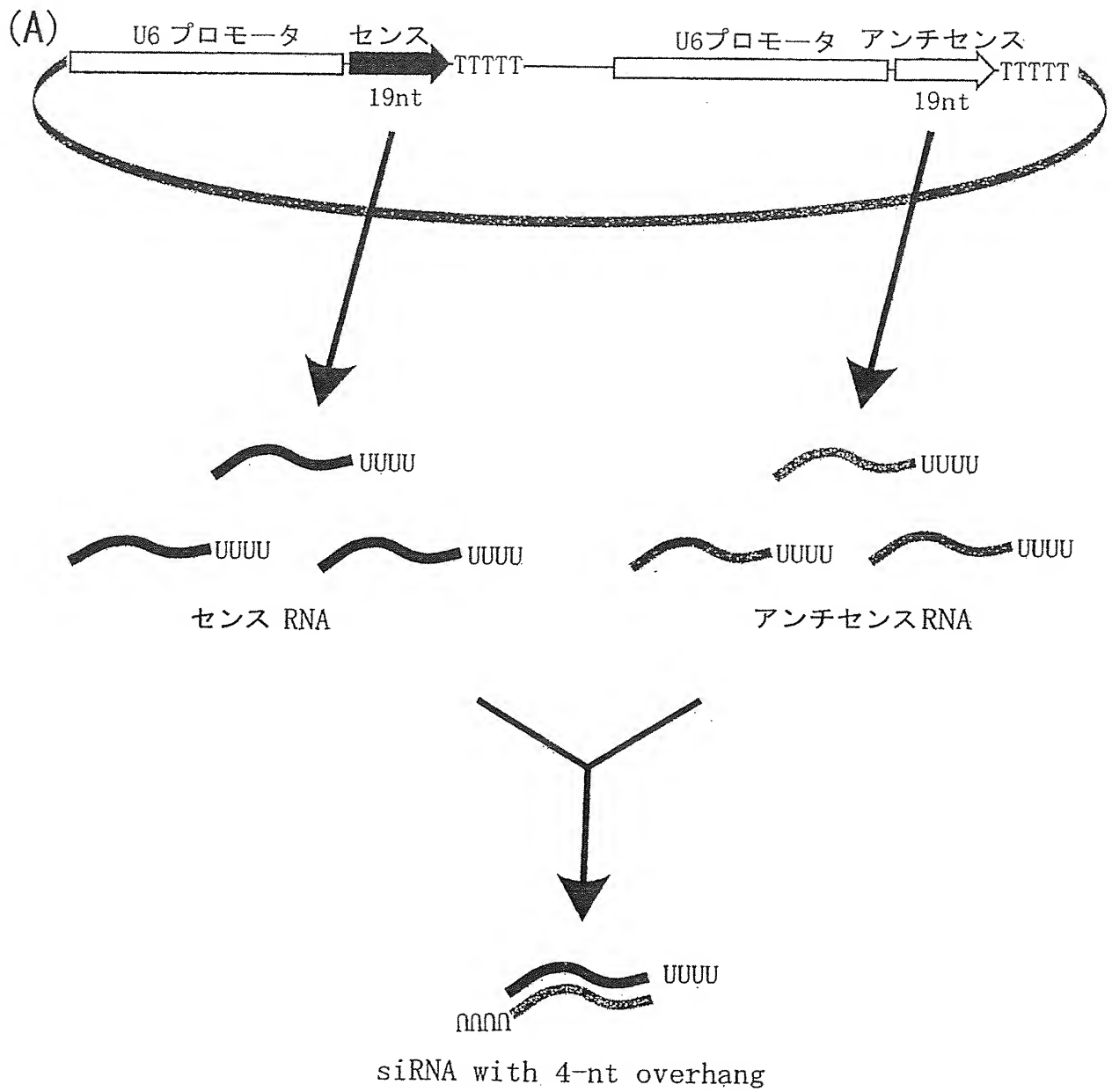


図 2

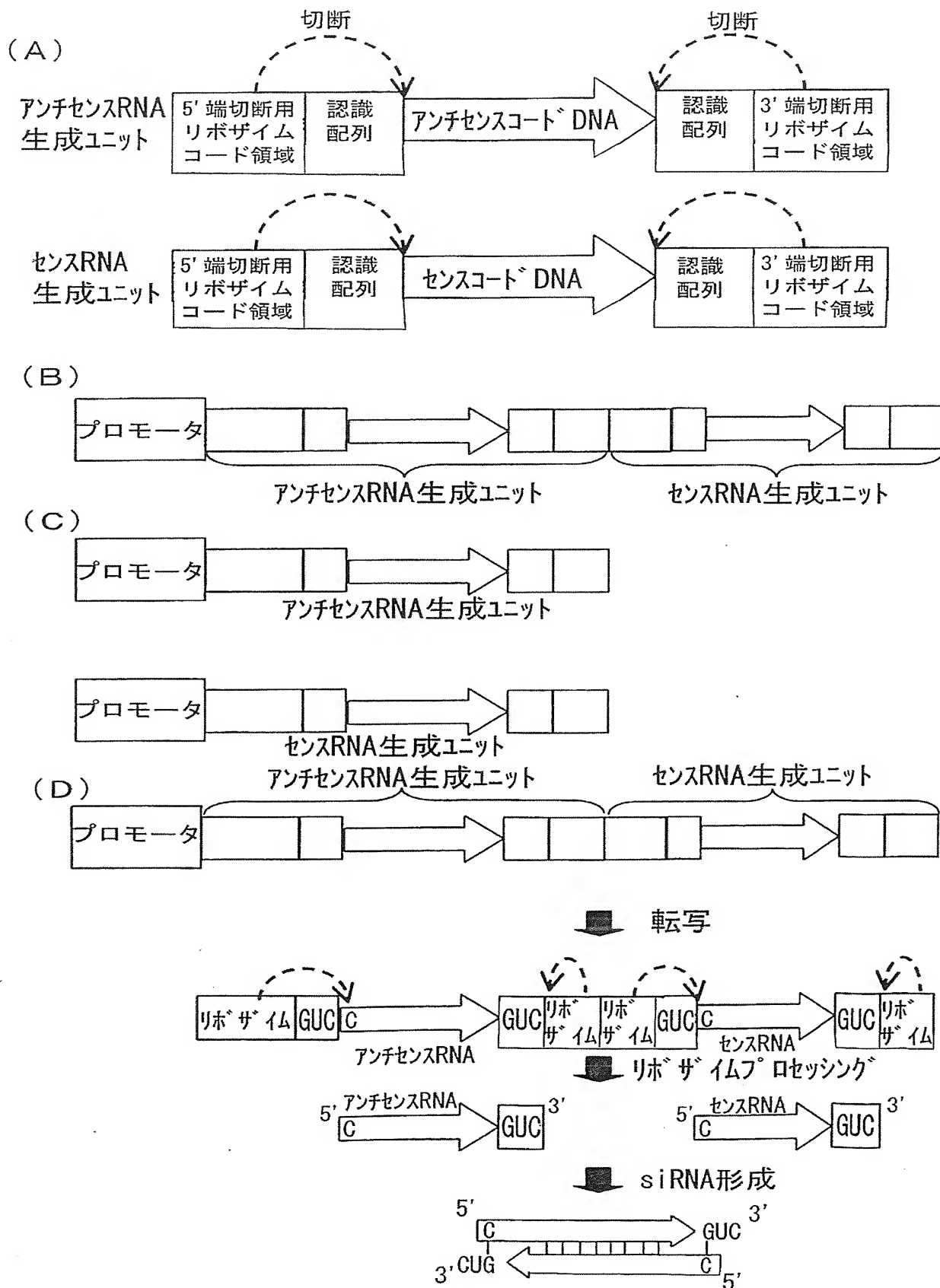
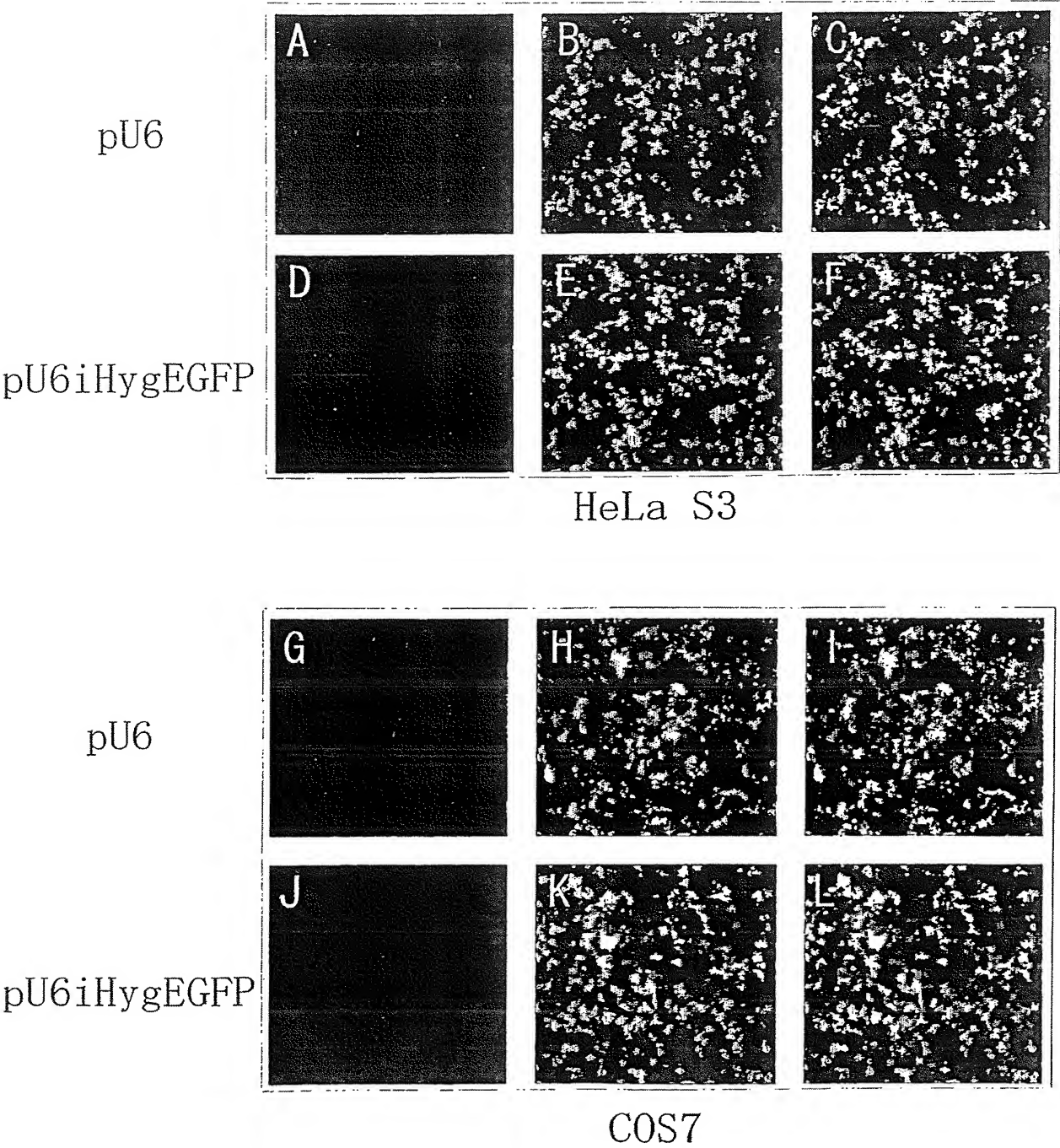


図 3



4 / 3 2

図 4

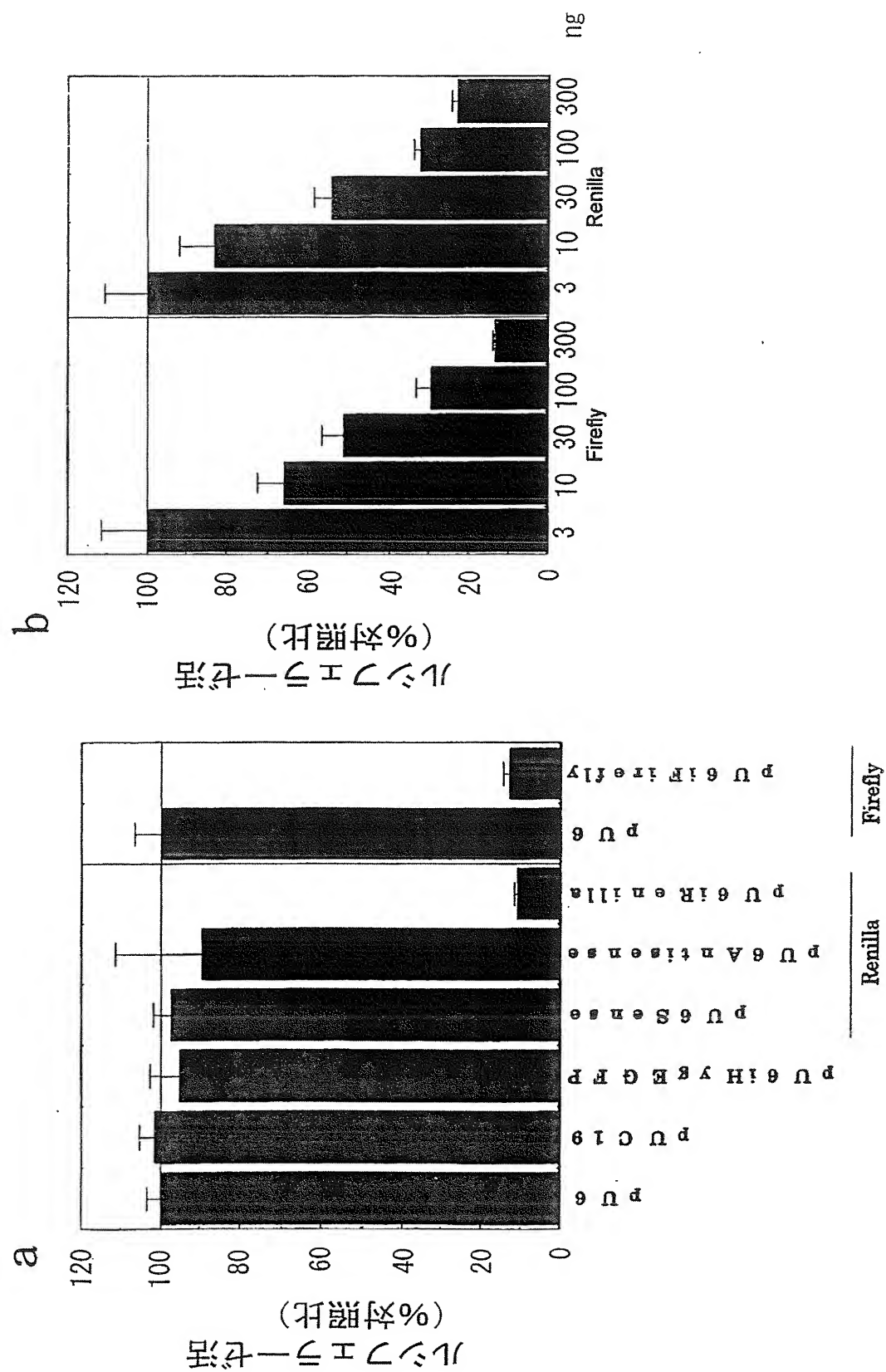
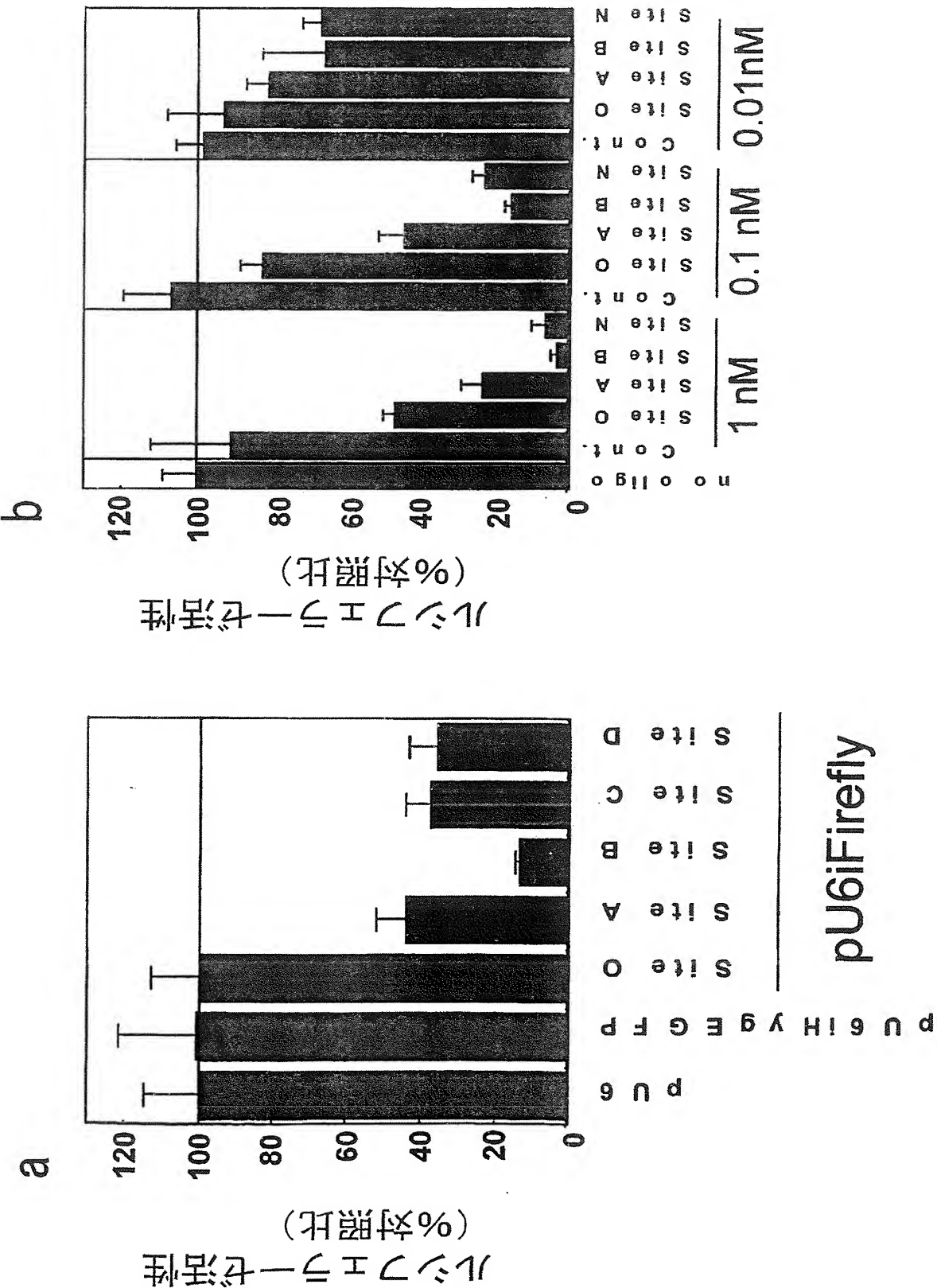
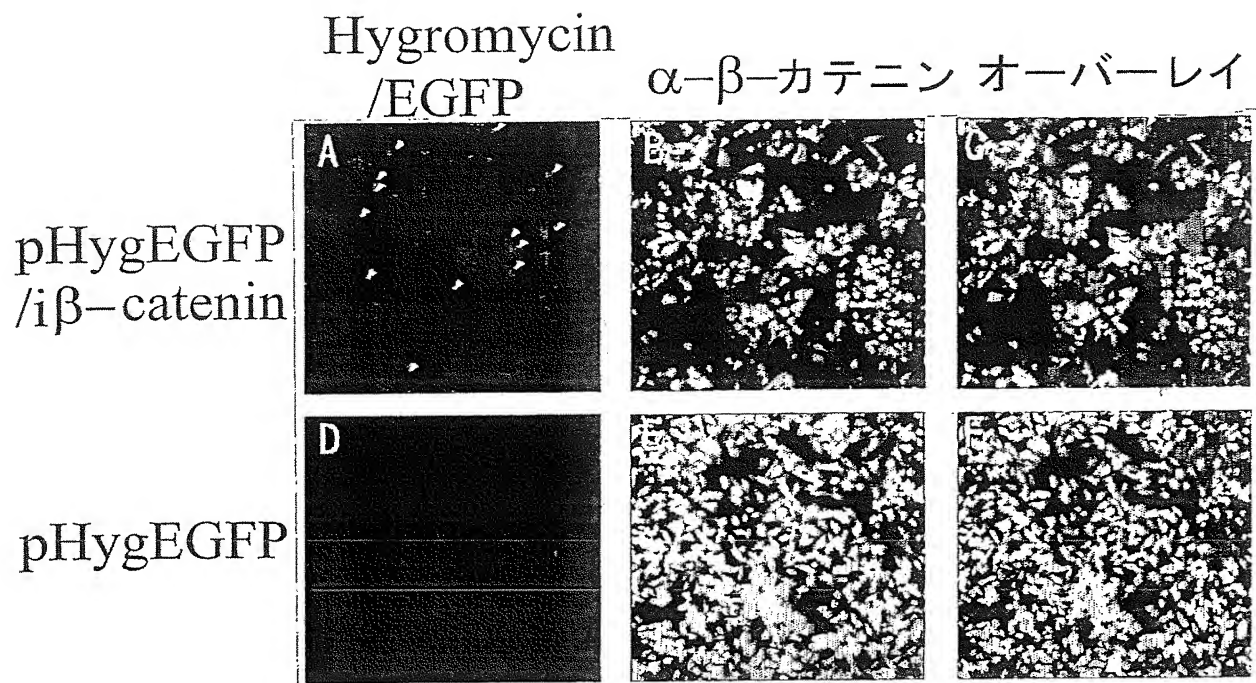


図 5



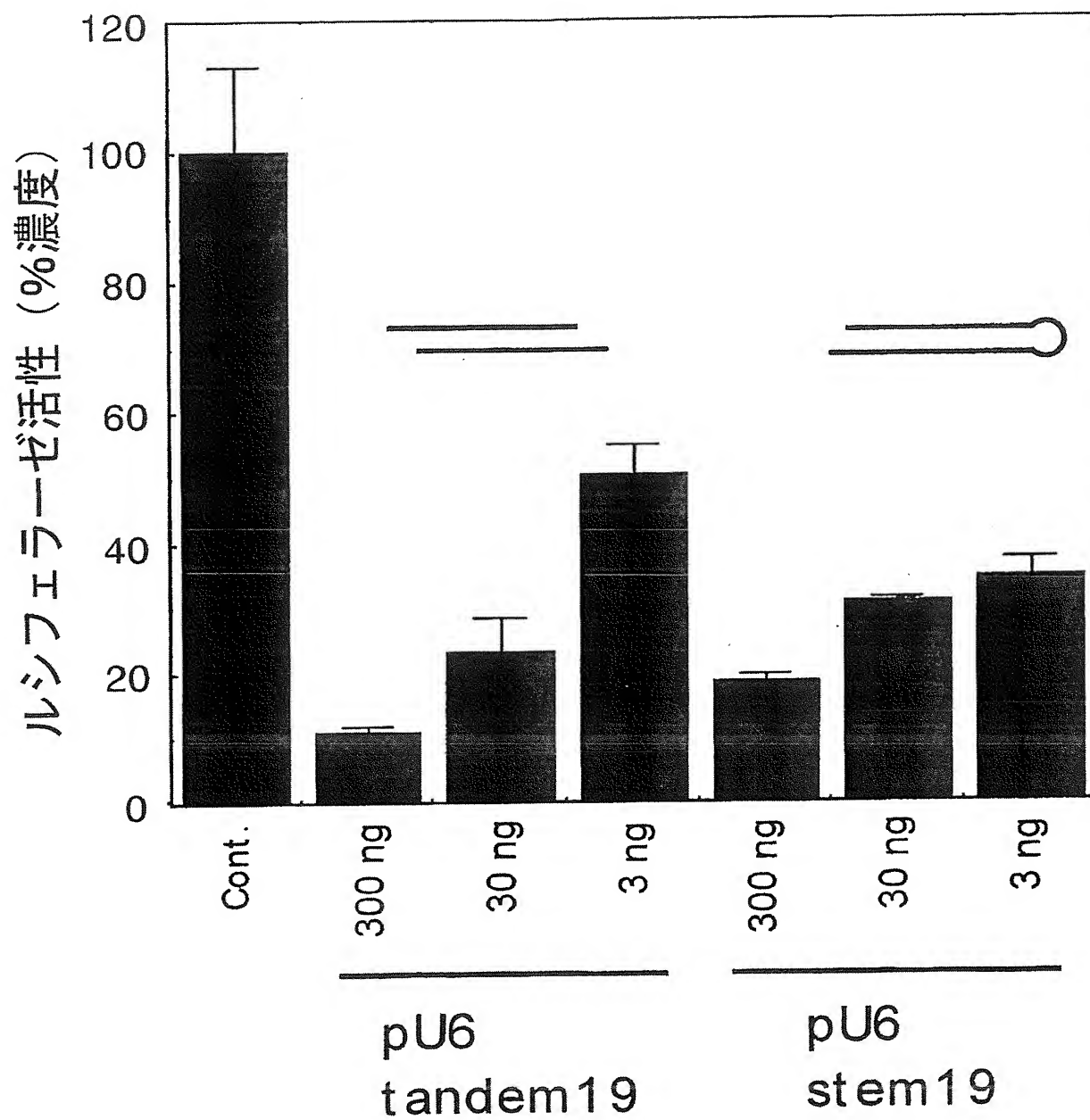
7 / 32

図 7



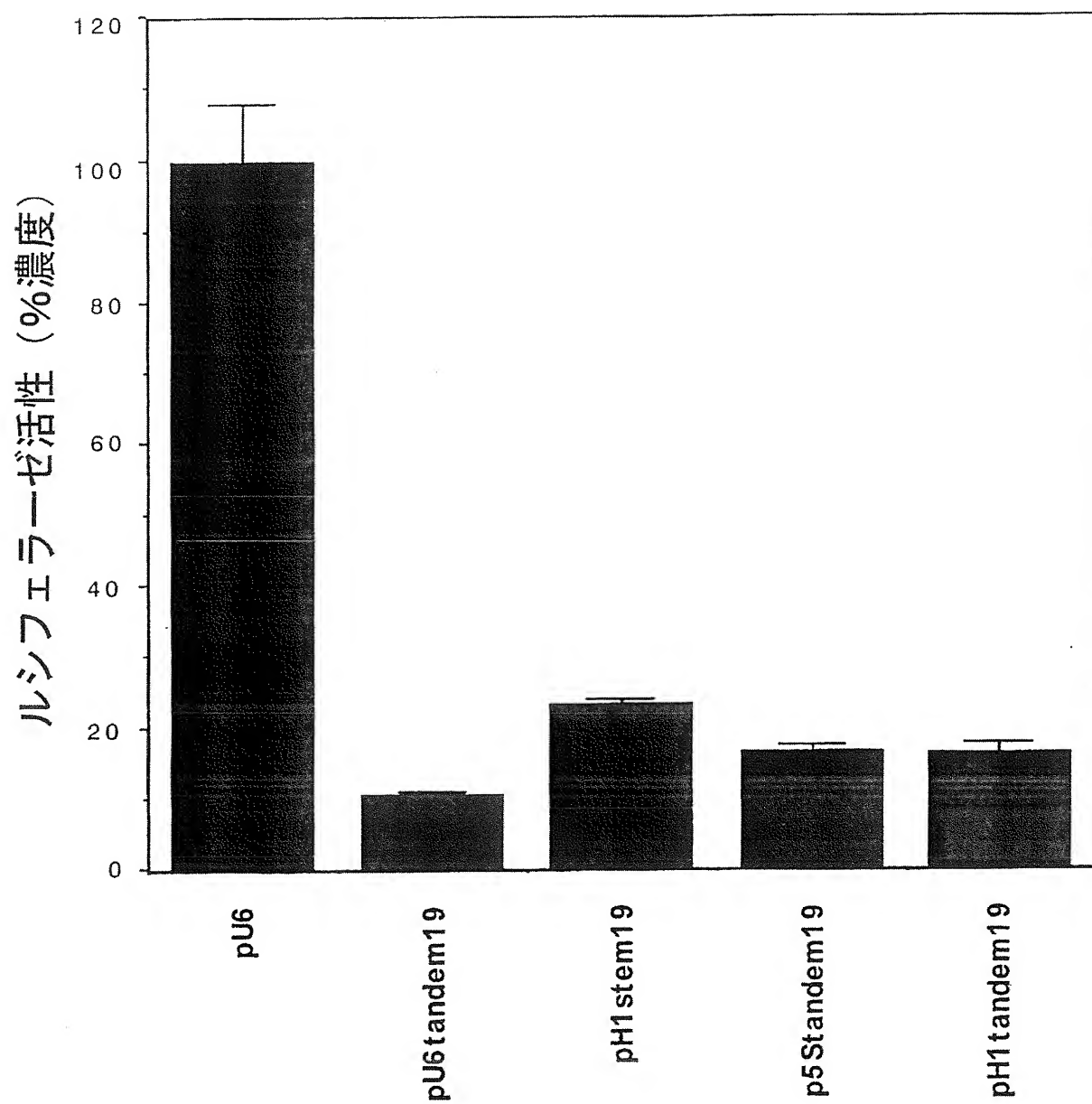
8 / 32

図 8



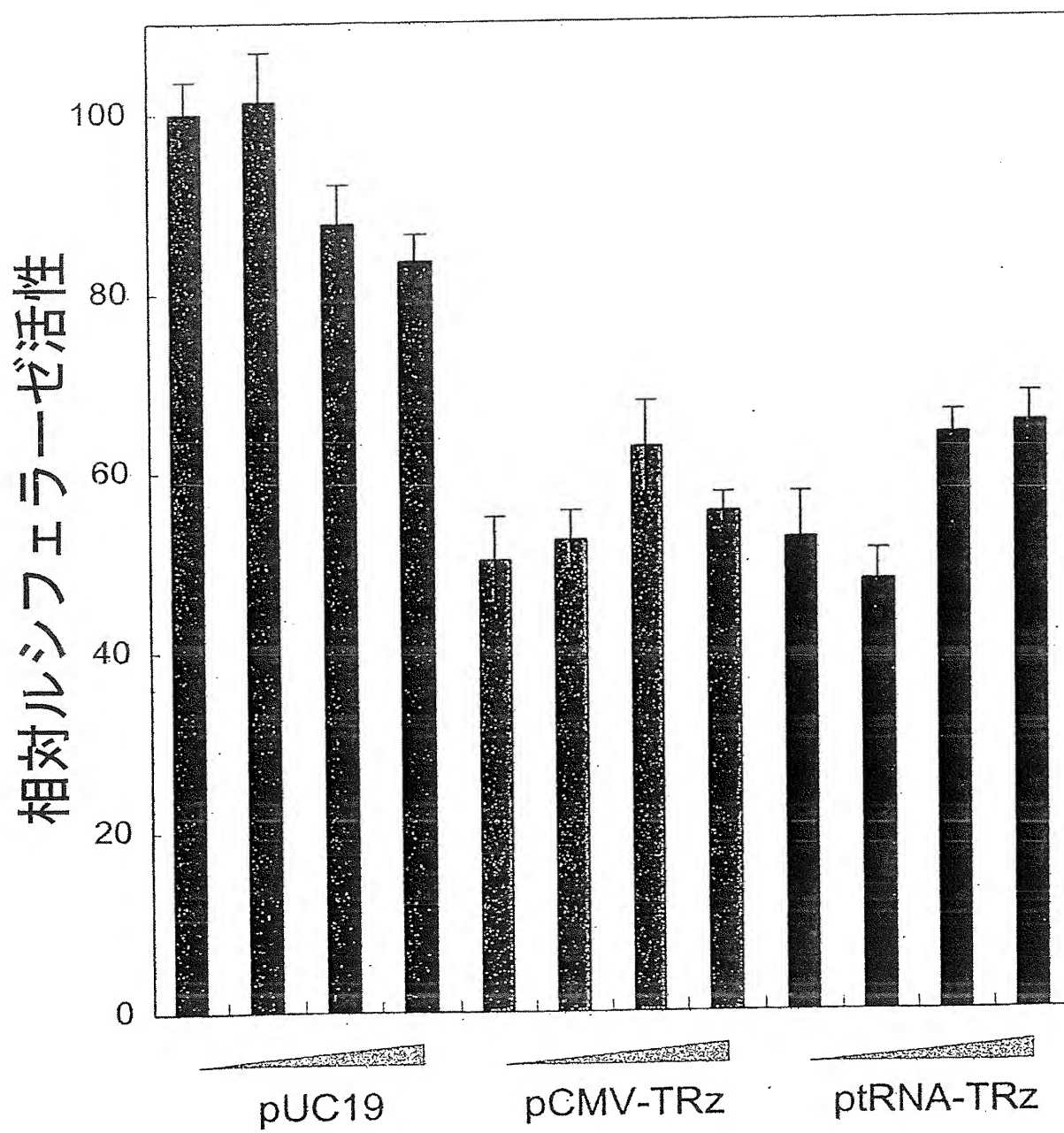
9 / 3 2

図 9



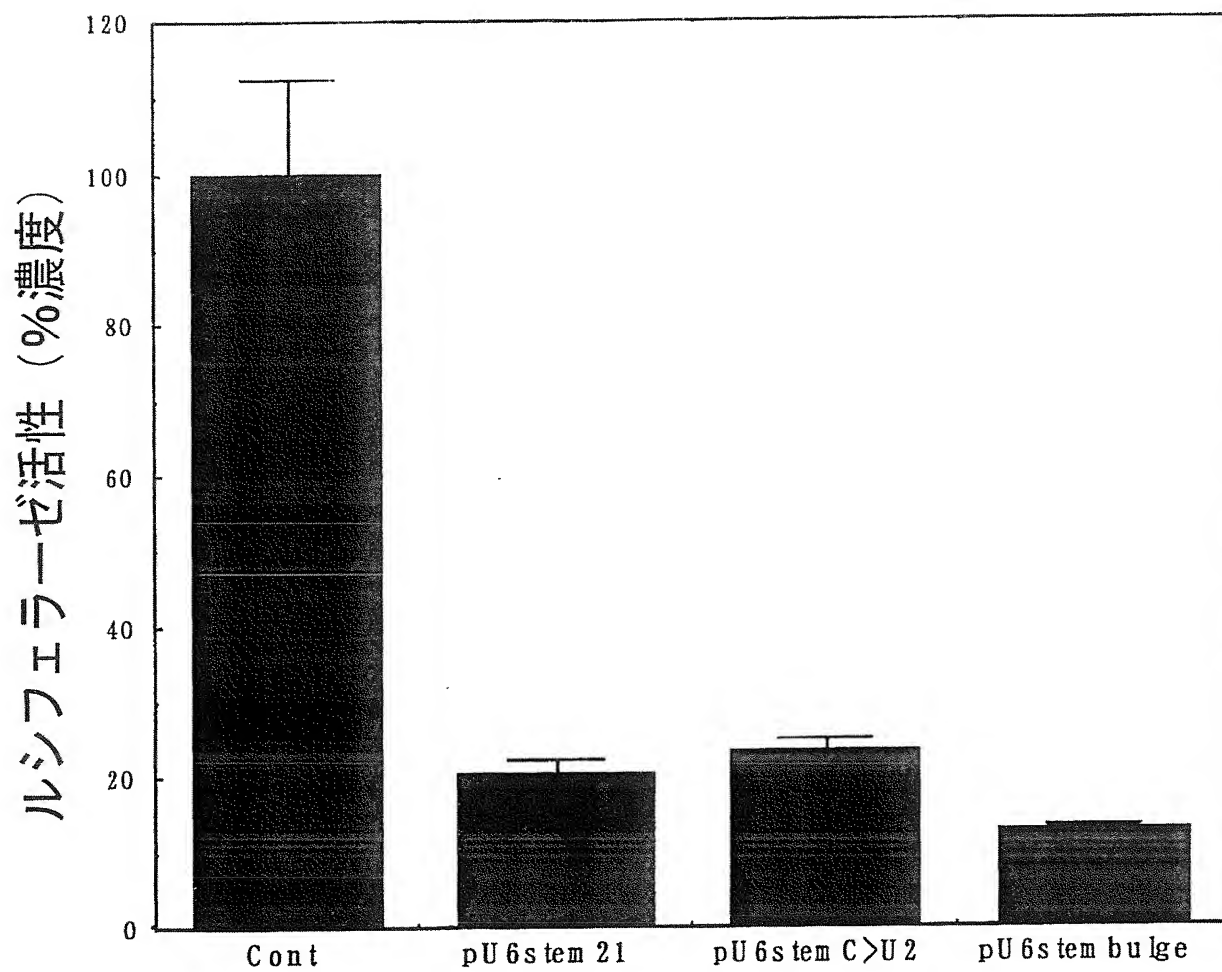
10/32

図 10



11 / 32

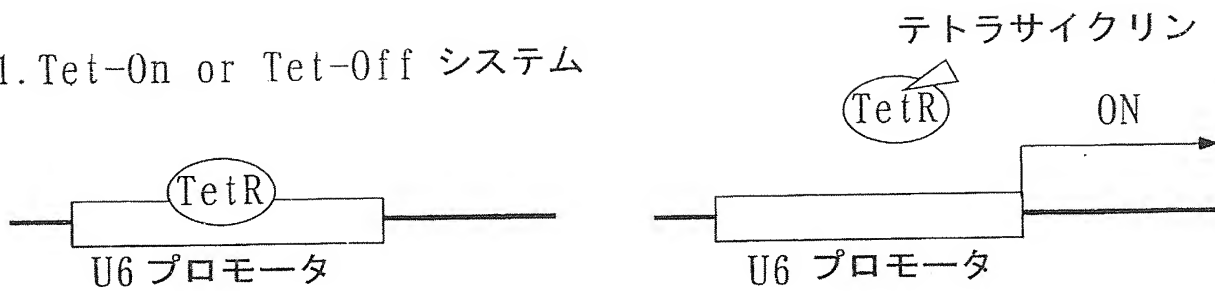
図 11



1 2 / 3 2

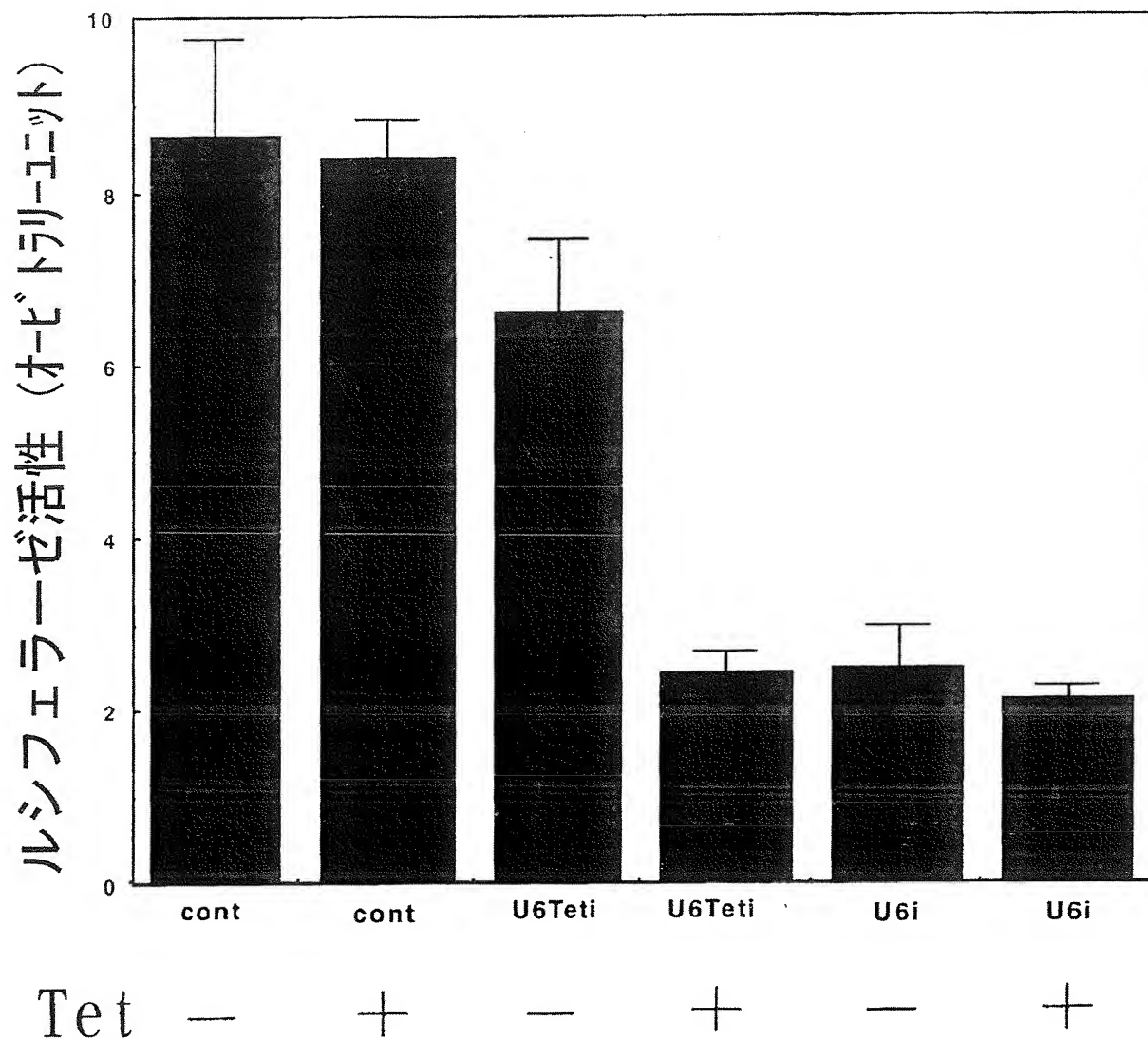
図 1 2

1. Tet-On or Tet-Off システム



13 / 32

図 13



14/32

図 14

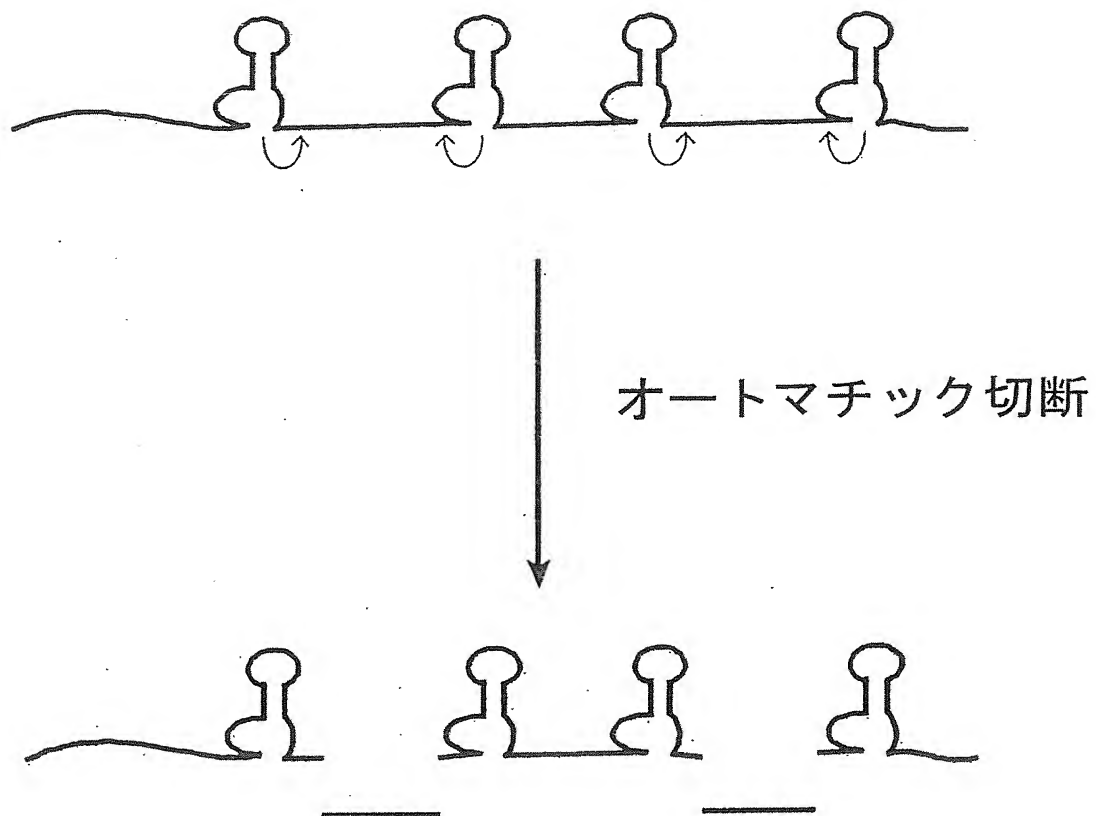
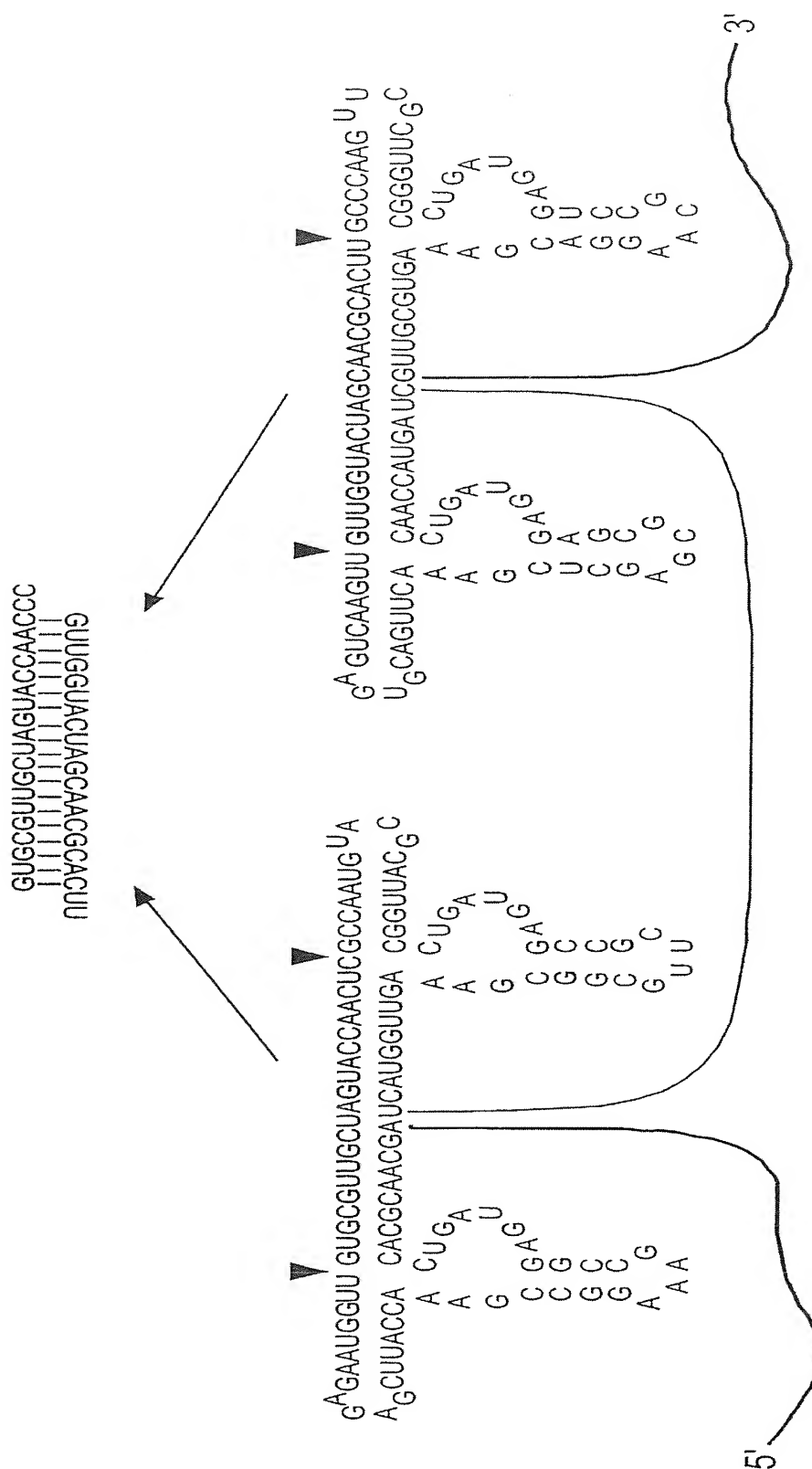


图 15



16 / 32

図 16

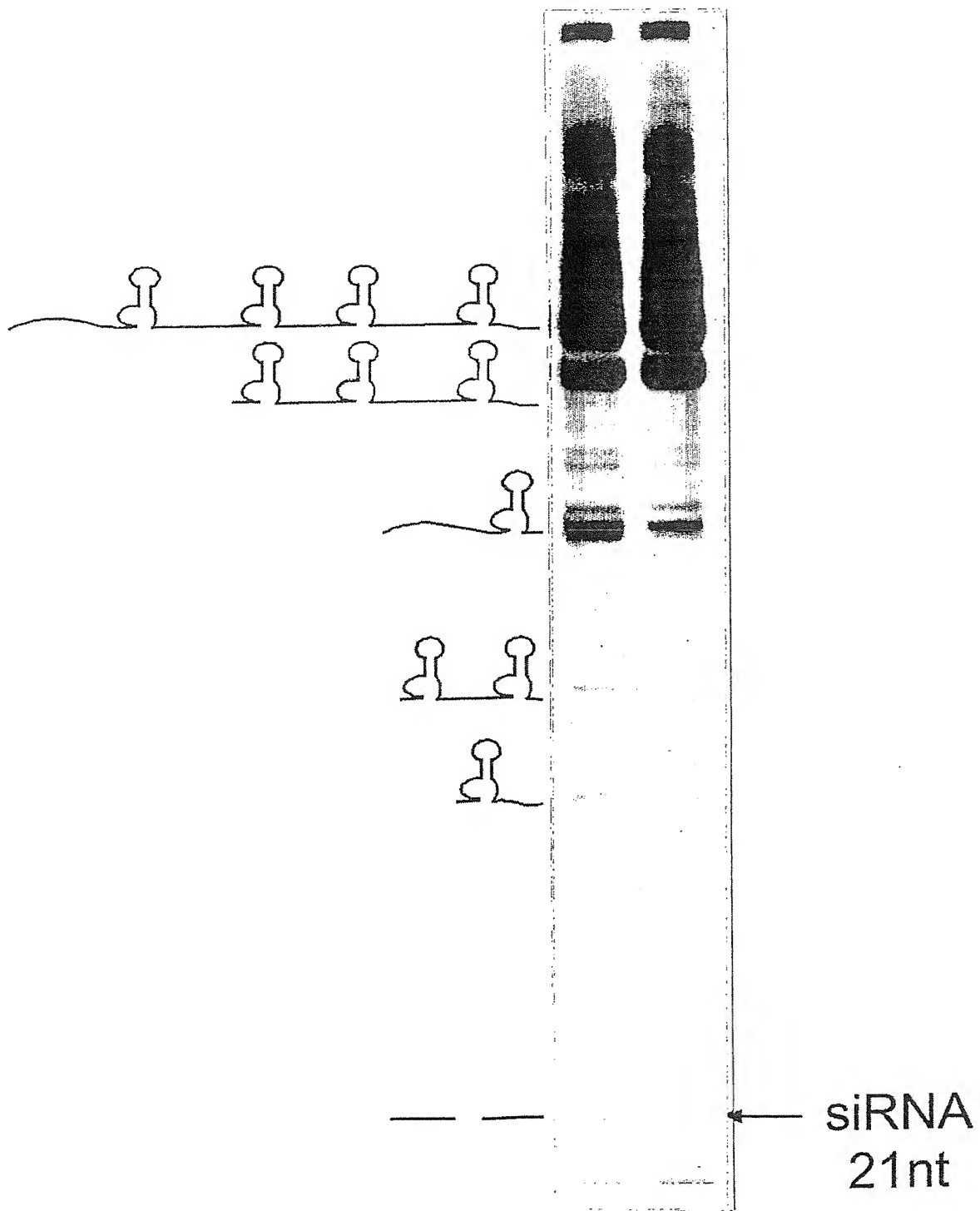
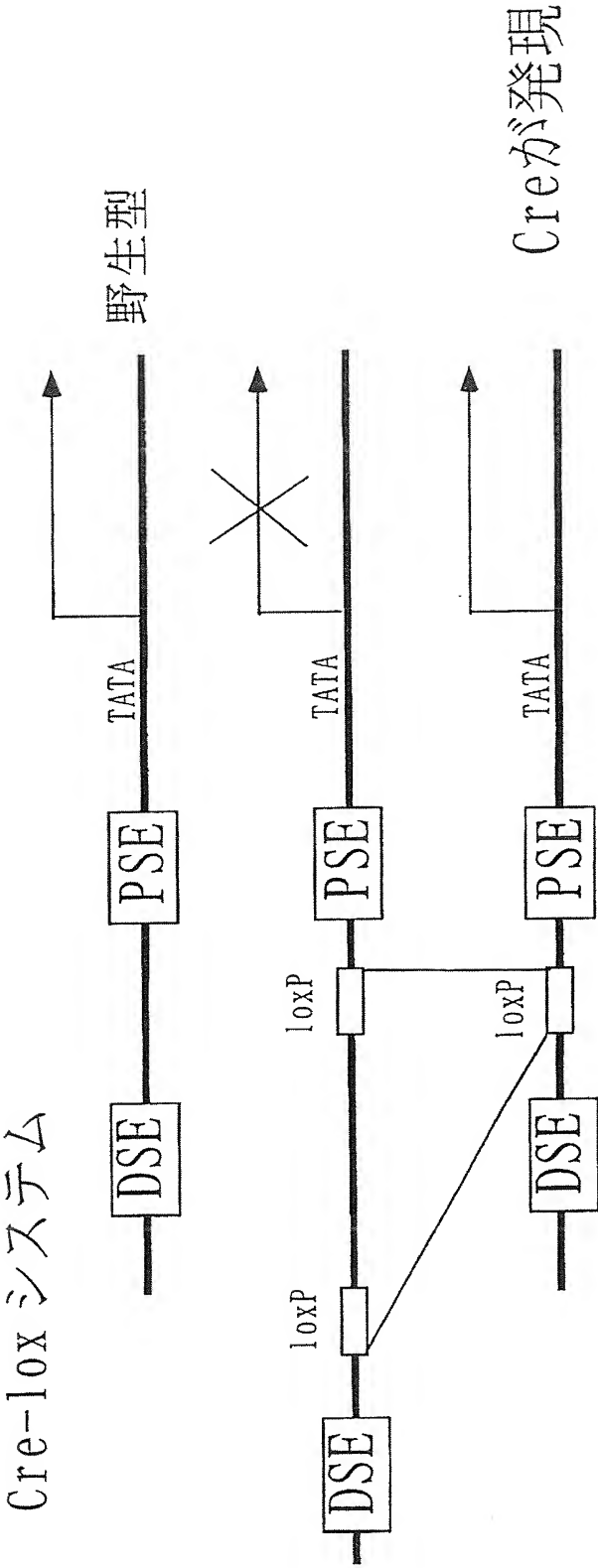


図 1 7



1 8 / 3 2

图 18

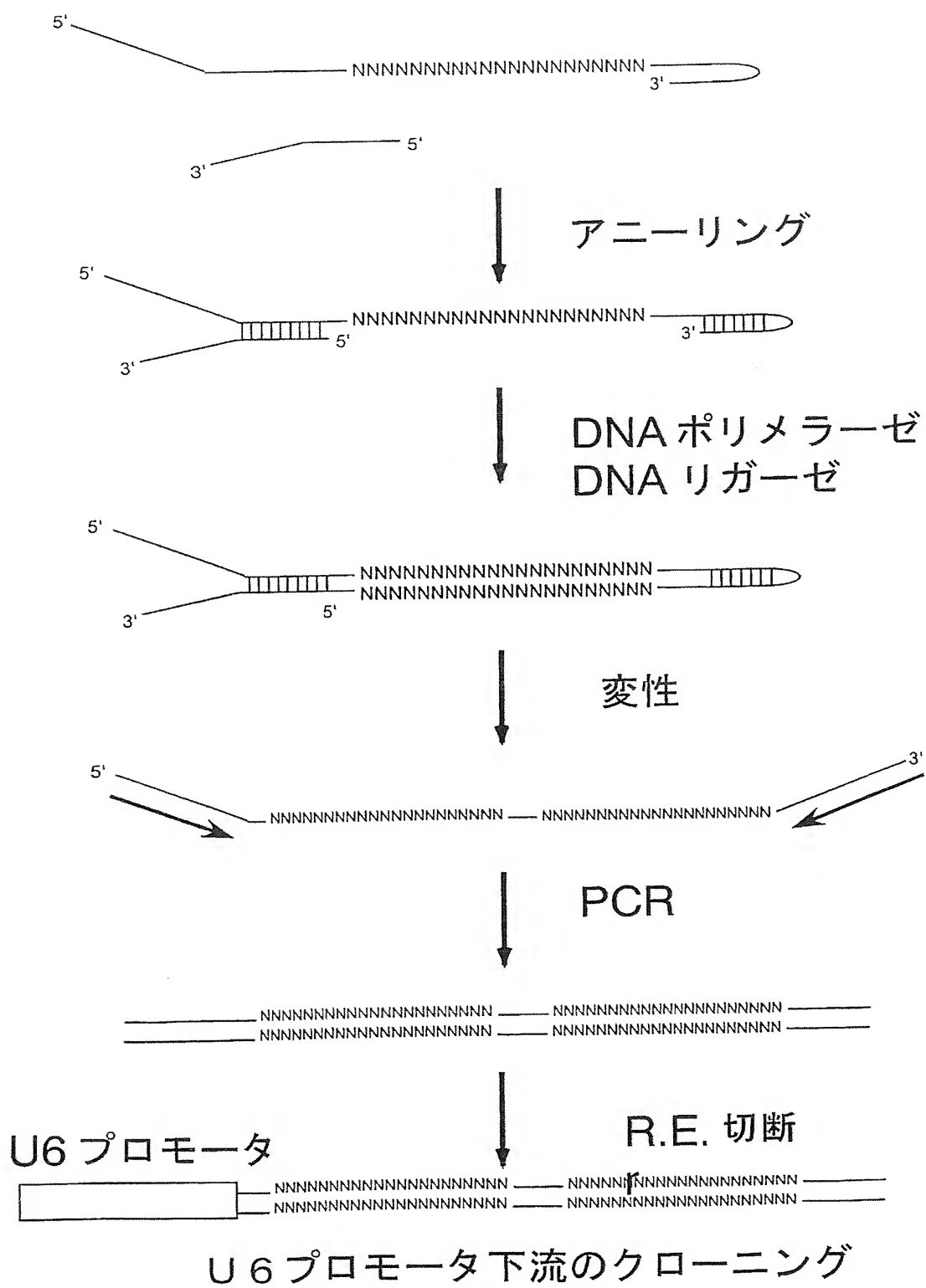
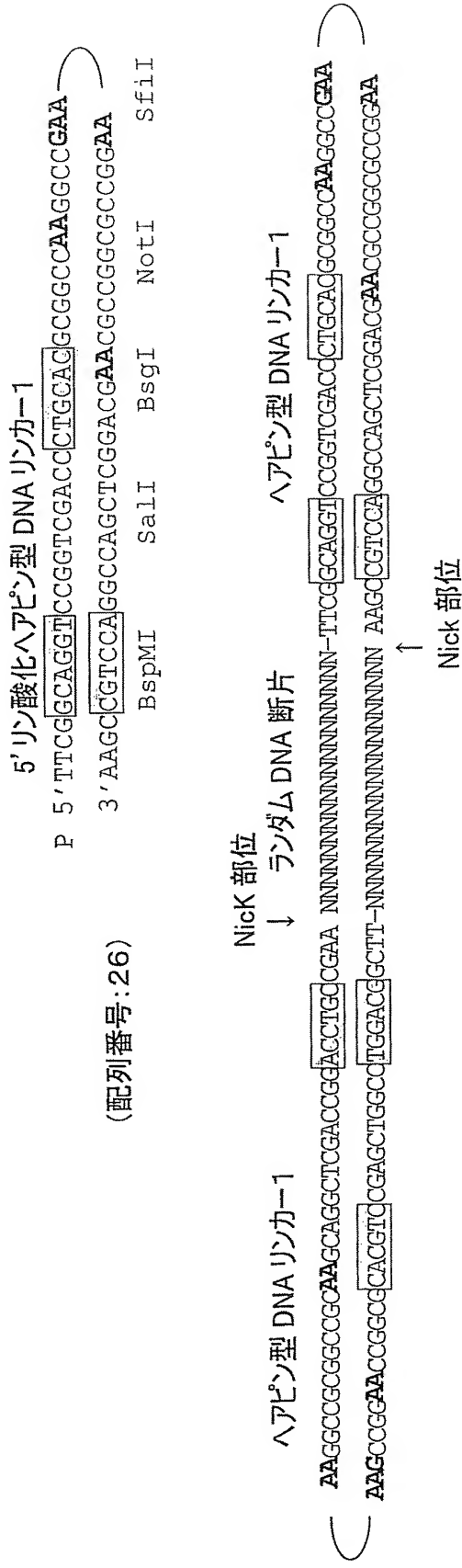


図 19

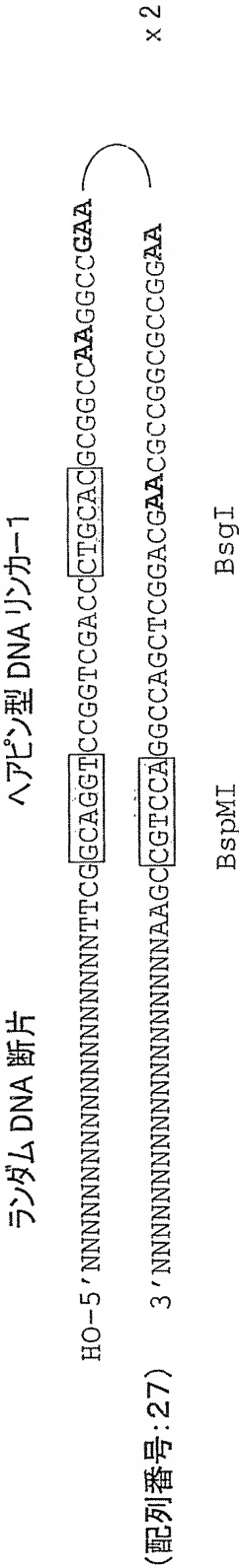
①

ランダム DNA 断片
HO 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
3' NNNNNNNNNNNNNNNNNN 5' OH
(配列番号:25)

②



③



④

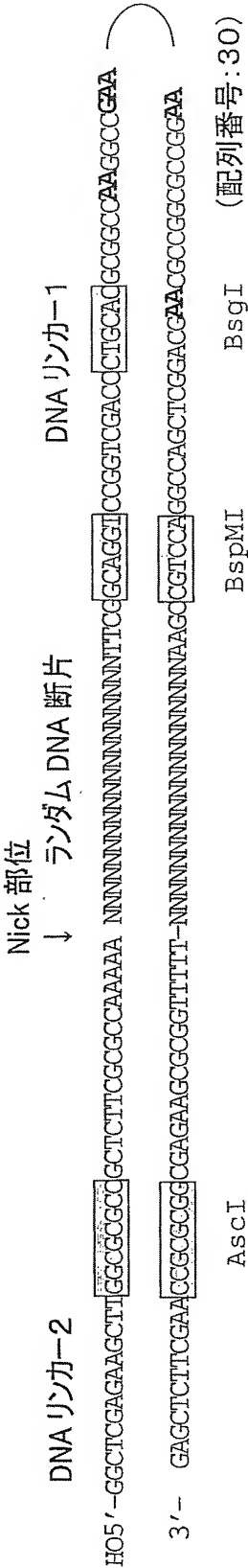
20 / 32

DNA リンカー-2

(配列番号:28)HO 5'-GGCTCGAGAAAGCTTGGCGCGCCGCTCTTCGCGCCAAAAA-3'

(配列番号:29)3'- GAGCTCTTCGAAACCGCGCGGCGAGAAAGCGCGGTTT-5'P

XhoI HindIII AscI SapI



24 / 32

図 2 4

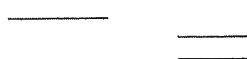
EGFP ORF の PCR 産物



DNaseI 処理



Klenow による修復、末端平滑化



約 20-25 bp の cDNA 断片を回収

サブクローニング

SwaI 切断クローニング部位

BseRI

BseRI

CGTGCAGGAGGAGACCTGCATTT3'

5' AAATGCAGGTCTCCTCCTGCACG

GCACGTCCTCCTCTGGACGTAAA5'

3' TTTACGTCCAGAGGAGGACGTGC

サブクローニングベクター pSwaI

BseRI

BseRI

CAGGAGGAGACCTGCATTT

N20-25

AAATGCAGGTCTCCTCCTG

GTCCTCCTCTGGACGTAAA

N20-25

TTTACGTCCAGAGGAGGAC

BseRI 切断によるインサート切り出し

P 5' - [N20-25] AA-3'

3' -AA [N20-25] -5' P

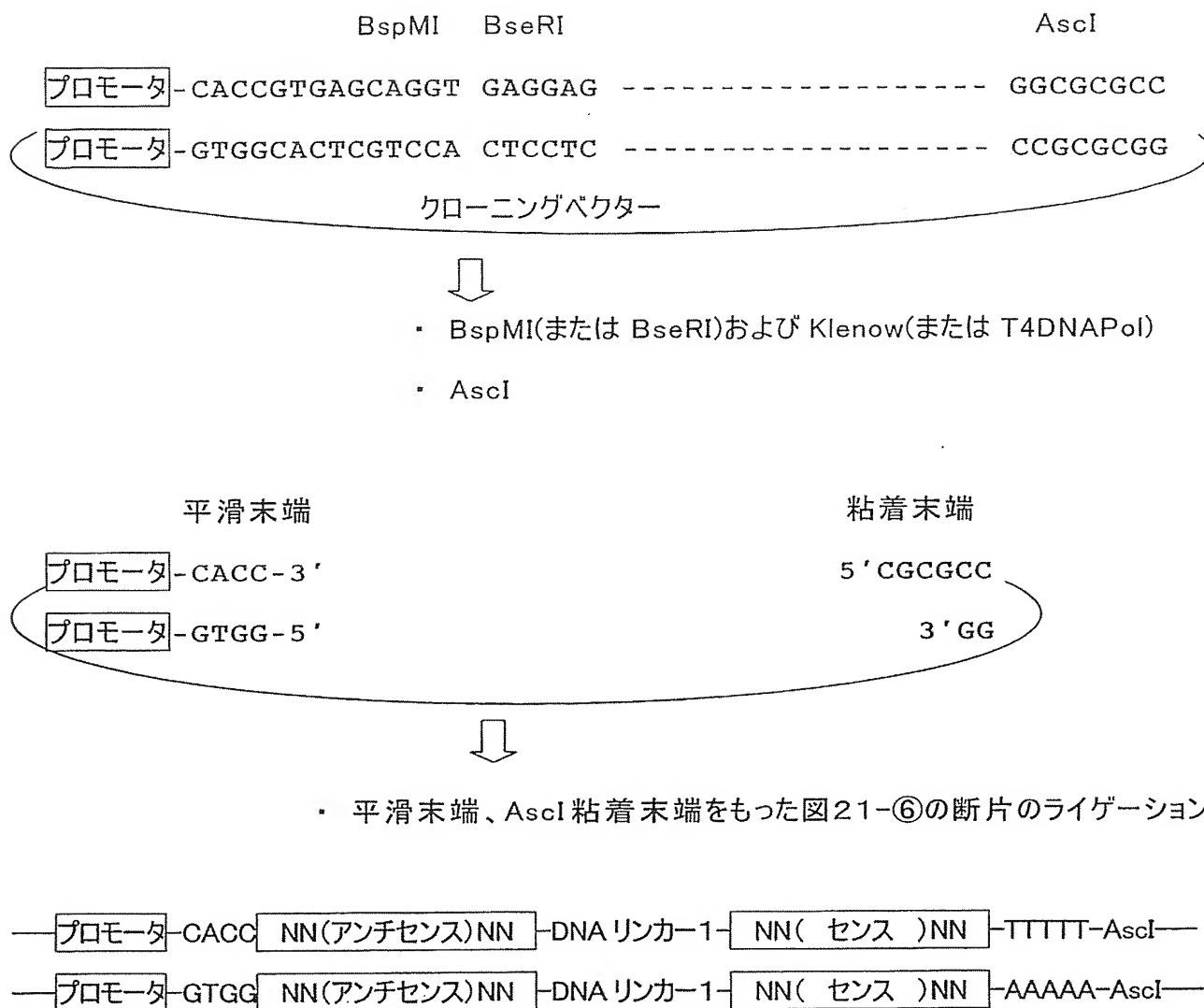
T4 DNA Polymerase による平滑末端化、CIAP による脱リン酸化

HO5' - [N20-25] -3'

3' - [N20-25] -5' OH

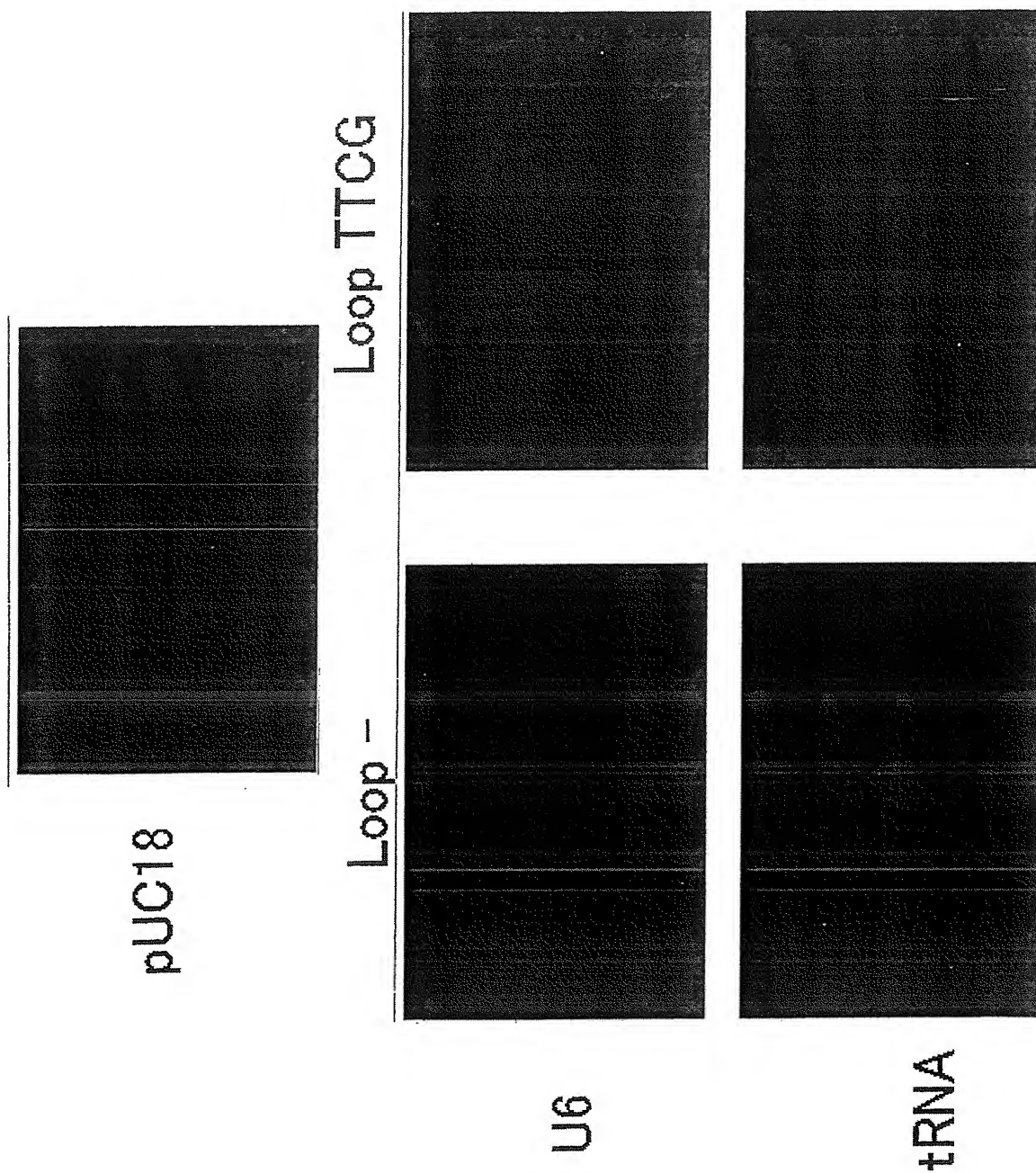
$$25 \div 32$$

图 25



26 / 32

図 26



27 / 32

図 27

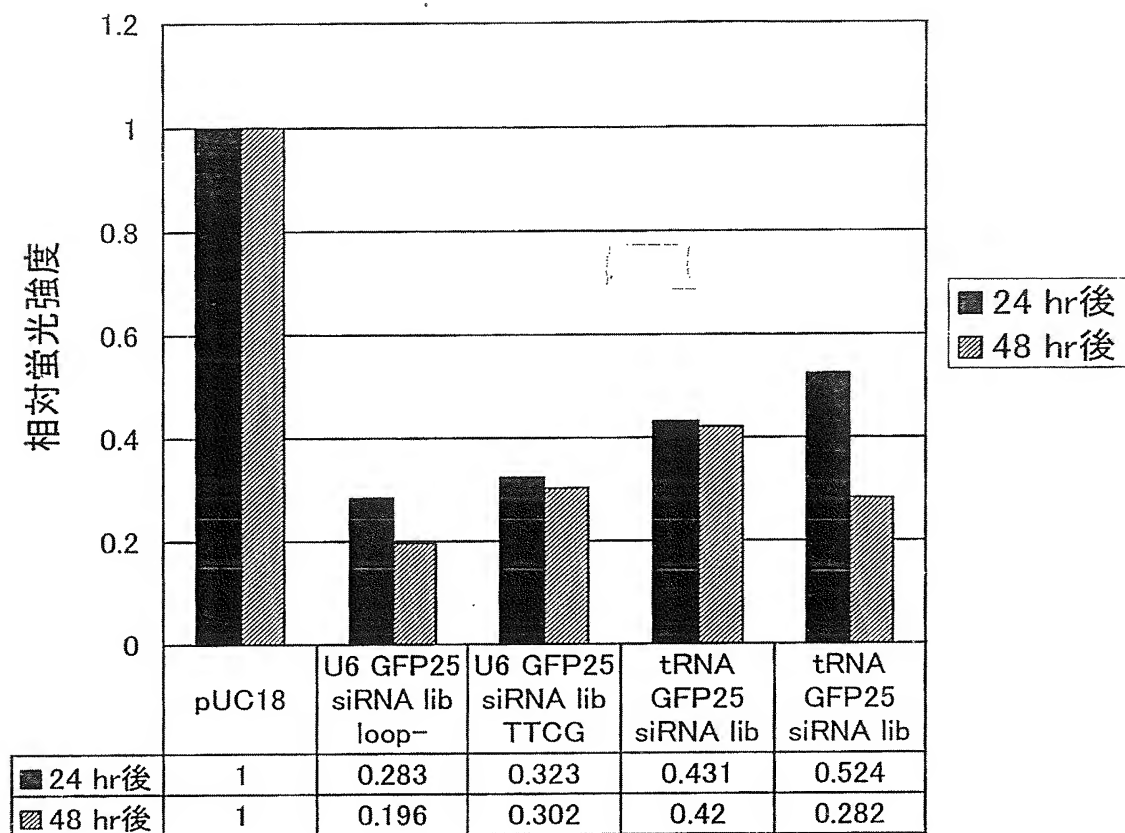
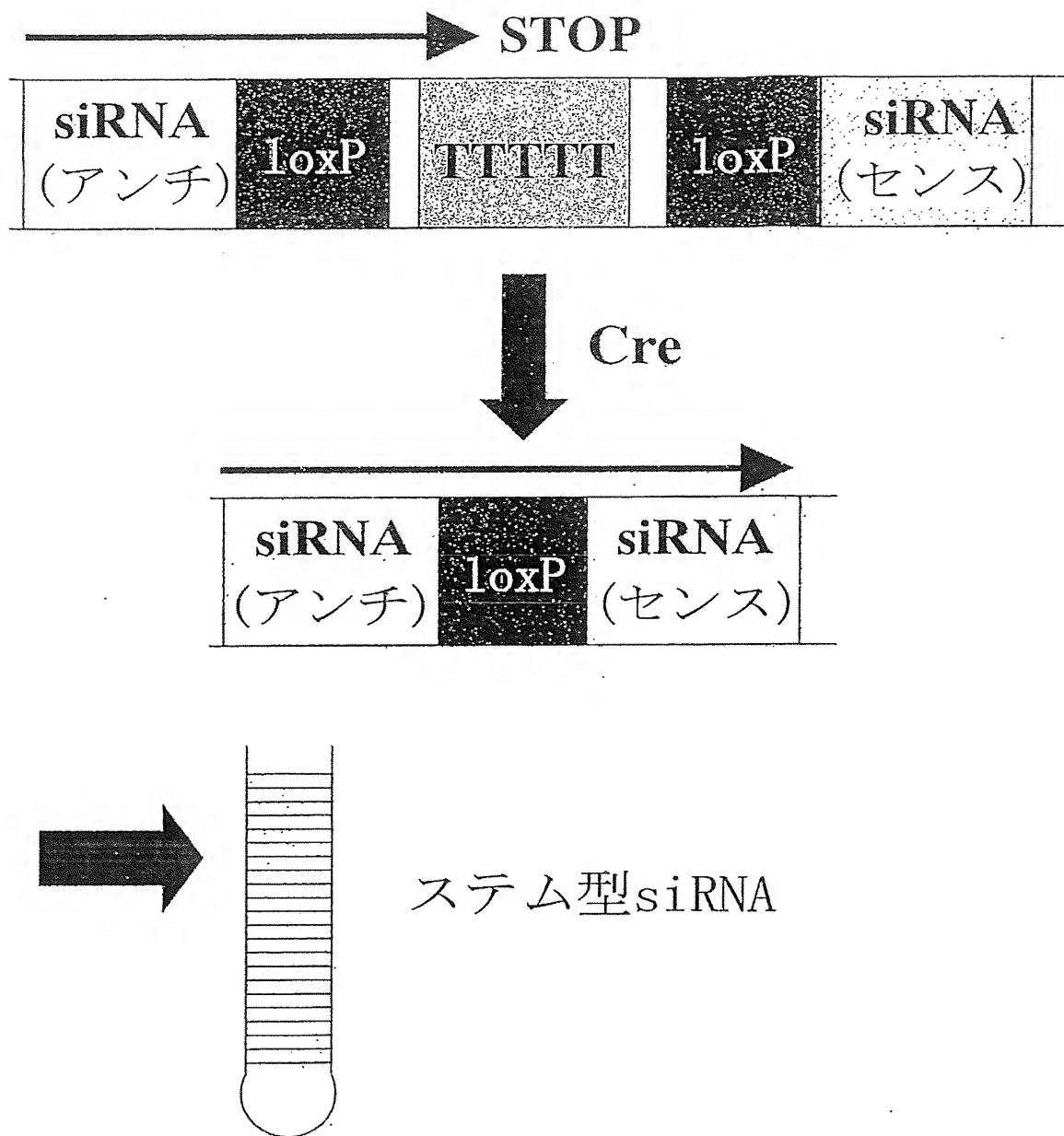
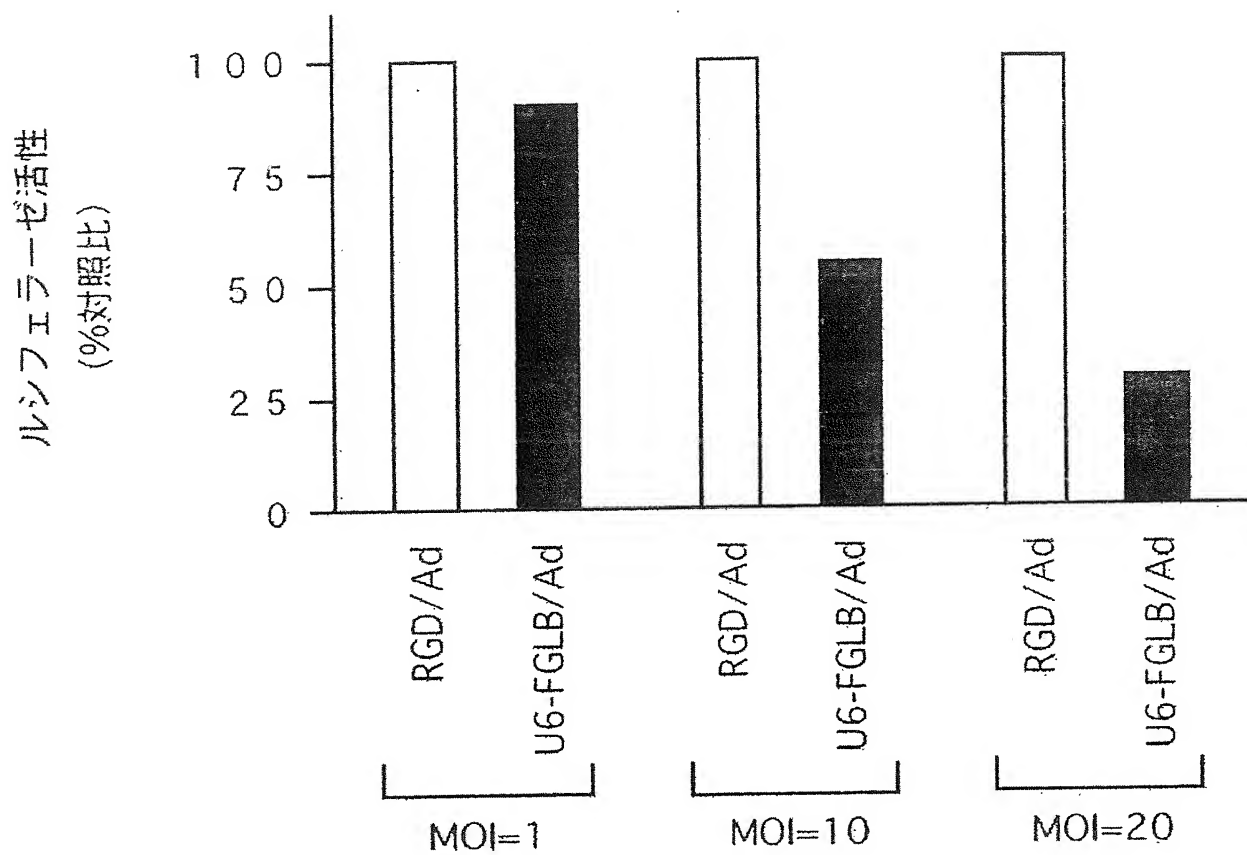


図 28



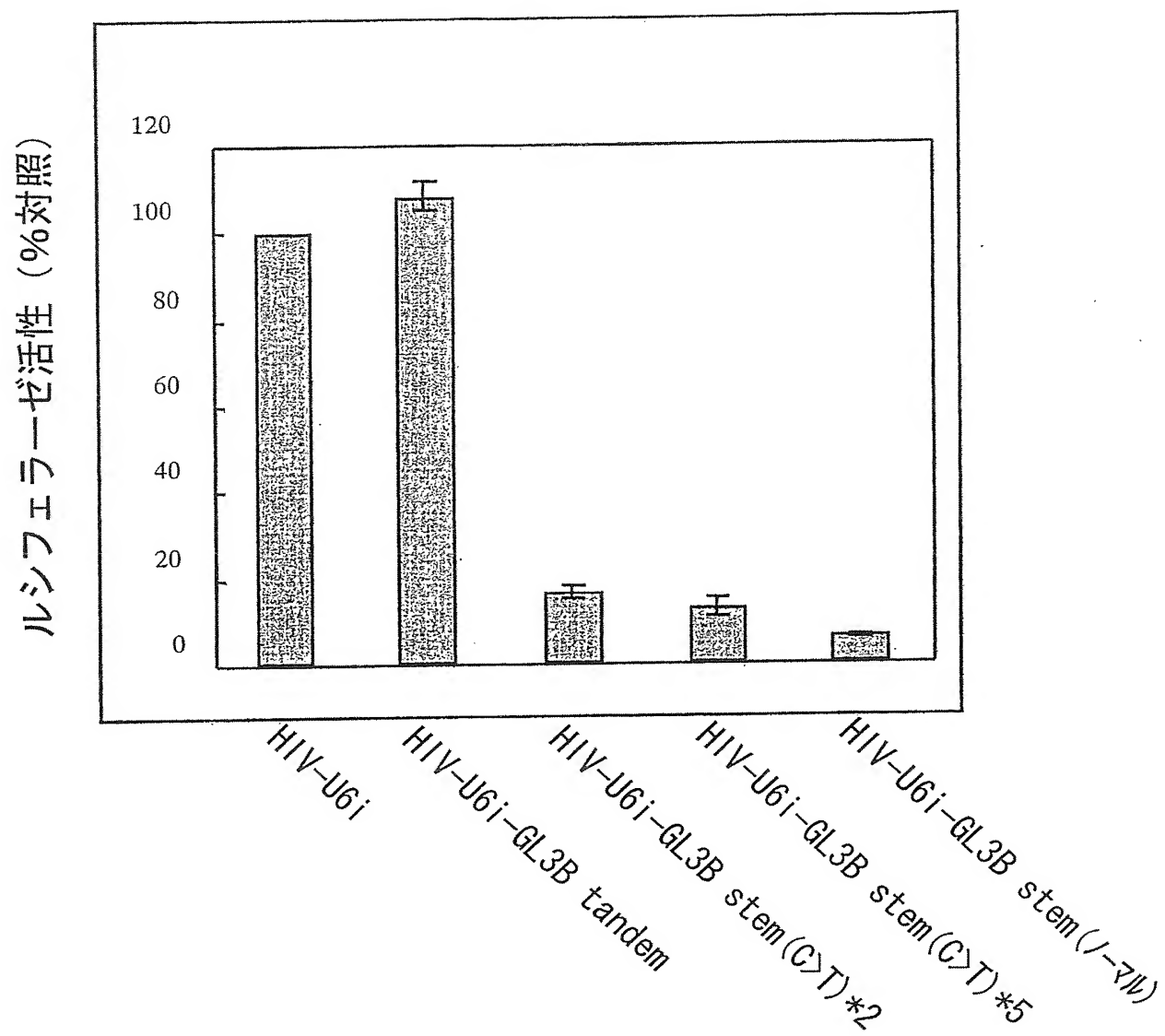
29 / 32

図 29



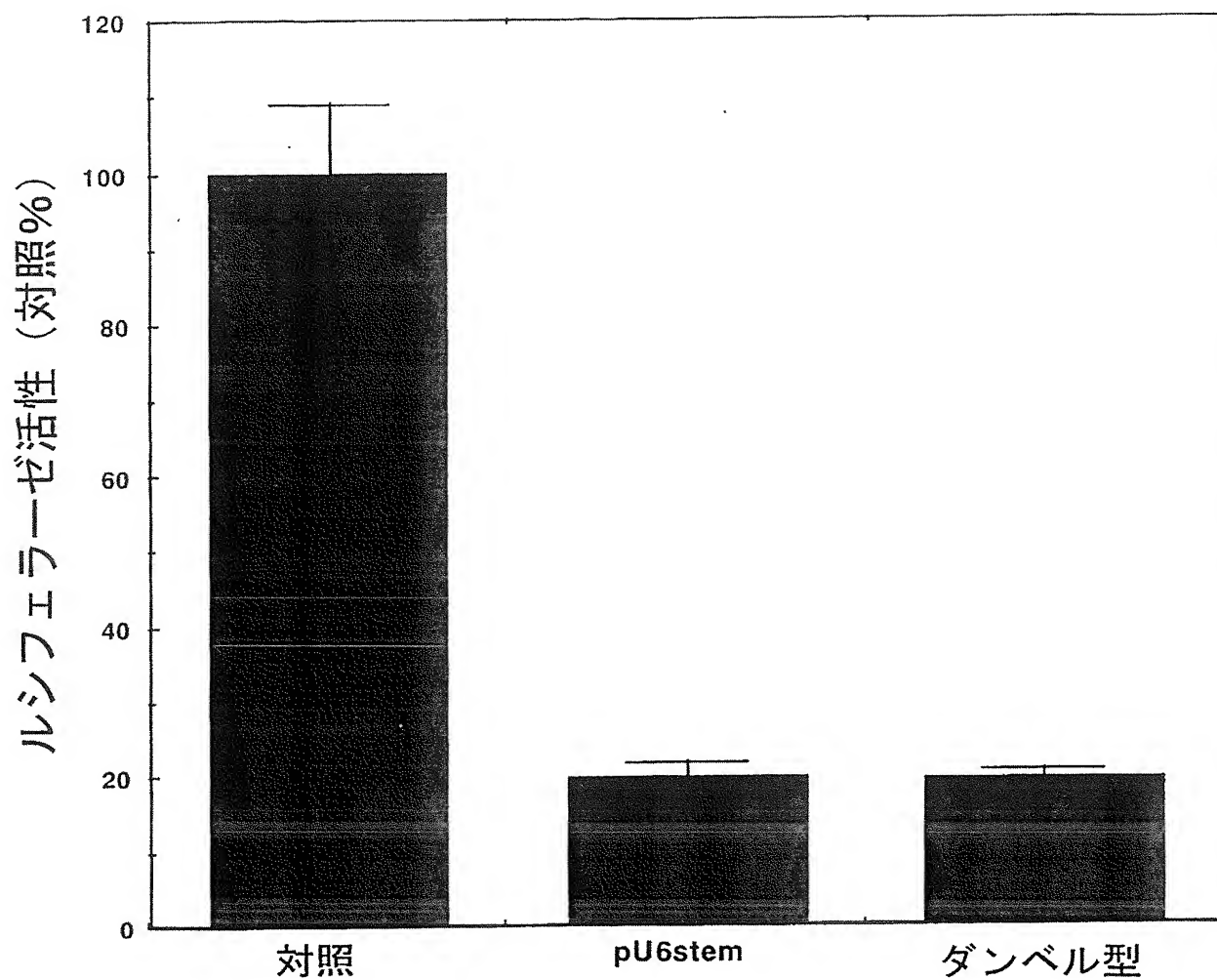
30 / 32

図 30



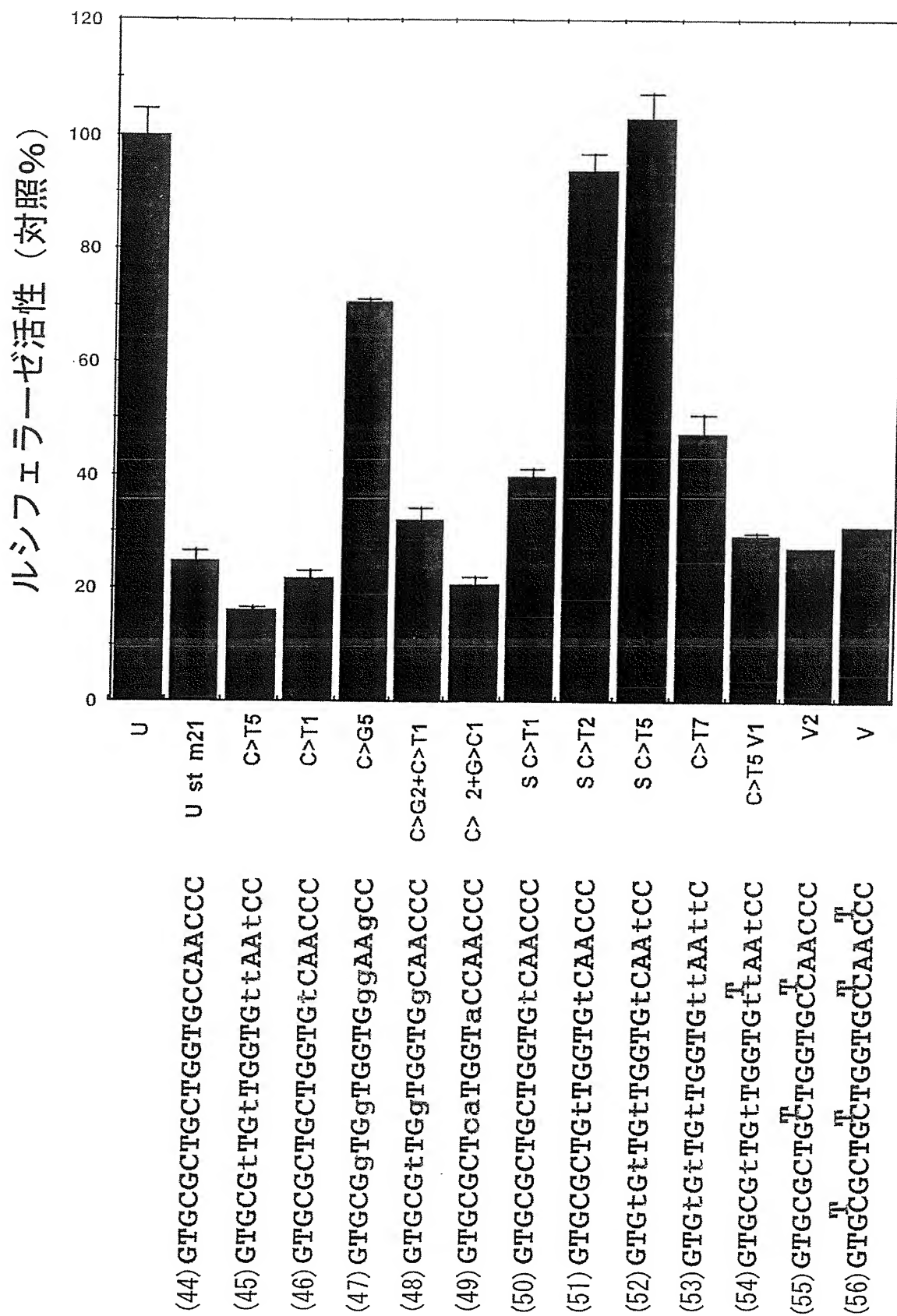
31 / 32

図 3 1



32 / 32

図 3 2



1 / 3 4

SEQUENCE LISTING

<110> CENTER FOR ADVANCED SCIENCE AND TECHNOLOGY INCUBATION, LTD.

<120> siRNA expression systems and methods for generating
cells with disrupting gene functions using the systems.

<130> SEN-A0124P2

<140>

<141>

<150> JP 2001-363385

<151> 2001-11-28

<150> PCT/JP02/11293

<151> 2002-10-30

<160> 57

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 1

gctatgaaac gatatgggc

19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 2

gcccatatcg tttcatagc

19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 3

gttcgtcaca tctcatctac

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 4

gtagatgaga tgtgacgaa

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

4 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 5

gtgcgctgct ggtgccaac

19

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 6

gttggcacca gcagcgcac

19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 7

atgtacacgt tcgtcacat

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 8

atgtgacgaa cgtgtacat

19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

6 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 9

gtagcgcggt gtattatac

19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 10

gtataataca ccgcgctac

19

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

7 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 11

gcuaugaaac gauaugggcu u

21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 12

gcccauauugc uuucauagcu u

21

<210> 13

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

8 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 13

guucgucaca ucucaucuac uu

22

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 14

guagaugaga ugugacgaau u

21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

9 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 15

gugcgcugcu ggugccaacu u

21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 16

guuggcacca gcagcgcacu u

21

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

1 0 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 17

auguacacgu ucguacauu u

21

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 18

augugacgaa cguguacauu u

21

<210> 19

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

1 1 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 19

guagcgcggu guauuauacu u

21

<210> 20

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 20

guauaauaca ccgcgcuaacu u

21

<210> 21

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

1 2 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 21

gtgcgctgct ggtgccaacg ugugcugucc gttggcacca gcagcgcac 49

<210> 22

<211> 53

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 22

gugcgugcu ggugccaacc cgugugcugu ccggguuggc accagcagcg cac 53

<210> 23

<211> 53

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

1 3 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 23

gugcgcuguu ggugucaacc cgugugcugu ccggguuggc accagcagcg cac 53

<210> 24

<211> 54

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 24

gugcgcugcu ggugcucaac ccgugugcug uccggguugg caccagcagc gcac 54

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

1 4 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (19)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 25

nnnnnnnnnn nnnnnnnnn

19

<210> 26

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 26

ttcggcaggt ccggtcgacc ctgcacgcgg ccaaggccga aaaggccgcg gccgcaagca 60

ggctcgaccg gacctgccga a

81

1 5 / 3 4

<210> 27

<211> 119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (101)..(119)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 27

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnt tcggcaggtc cggtcgaccc tgcacgcggc caaggccgaa 60
aaggccgcgg ccgcaagcag gctcgaccgg acctgccgaa nnnnnnnnnn nnnnnnnnn 119

1 6 / 3 4

<210> 28

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 28

ggctcgagaa gcttggcgcg ccgctcttcg cgccaaaaa

39

<210> 29

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 29

tttttggcgc gaagagcggc gcgccaagct tctcgag

37

1 7 / 3 4

<210> 30

<211> 195

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (39).. (58)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (139).. (158)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 30

ggctcgagaa gcttggcgcg ccgctcttcg cgccaaaaan nnnnnnnnnn nnnnnnnntt 60
cggcaggtcc ggtcgacct gcacgcggcc aaggccgaaa aggccgcggc cgcaagcagg 120
ctcgaccgga cctgccgaan nnnnnnnnnn nnnnnnnntt tttggcgcca agagcggcgc 180
gccaagcttc tcgag 195

1 8 / 3 4

<210> 31

<211> 152

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (39).. (55)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (137).. (152)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 31

ggctcgagaa gcttggcgcg ccgctcttcg cgccaaaaan nnnnnnnnnn nnnnnttcgg 60
caggtccggt cgaccctgct tgcggccgcg gccttttcgg ccttggccgc gtgcagggtc 120
gaccggacct gccgaannnn nnnnnnnnnn nn 152

<210> 32

19 / 34

<211> 152

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (98)..(113)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 32

nnnnnnnnnn nnnnnnttcg gcaggtccgg tcgaccctgc acgcggccaa ggccgaaaag 60
gccgcggccg caagcagggt cgaccggacc tgccgaannn nnnnnnnnnn nnnttttttg 120
cgcgaagagc ggcgcgccaa gcttctcgag cc 152

<210> 33

<211> 142

20 / 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (24).. (42)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (124).. (142)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 33

cgcgccgctc ttcgcgccaa aaannnnnnn nnnnnnnnnn nnttcggcag gtccgggtcga 60
ccctgcttgc ggccgcggcc ttttcggcct tggccgcgtg cagggtcgac cggacctgcc 120
gaannnnnnn nnnnnnnnnn nn 142

<210> 34

<211> 138

<212> DNA

2 1 / 3 4

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (101)..(119)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 34

```
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnt tcggcaggtc cggtcgaccc tgcacgcggc caaggccgaa 60
aaggccgcgg ccgcaagcag ggtcgaccgg acctgccgaa nnnnnnnnnn nnnnnnnnnt 120
ttttggcgcg aagagcgg                                     138
```

<210> 35

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2 2 / 3 4

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (6).. (43)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 35

aaaaannnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnn

43

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (38)

2 3 / 3 4

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 36

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntt ttt

43

<210> 37

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (6).. (24)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (29).. (47)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 37

2 4 / 3 4

aaaaannnnn nnnnnnnnnn nnnnngaann nnnnnnnnnn nnnnnnn

47

<210> 38

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (19)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<220>

<221> misc_feature

<222> (24).. (42)

<223> "n" = any one base of a, t, g, or c.

<400> 38

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnt tcgnnnnnnn nnnnnnnnnn nnttttt

47

2 5 / 3 4

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 39

cccgtgcctt ggcccaccct cgtg

24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 40

cacgagggtg ggccagggca cggg

24

2 6 / 3 4

<210> 41

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 41

accaggatgg gcaccacccc ggtg

24

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 42

caccgggggtg gtgcccatcc tggt

24

2 7 / 3 4

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 43

gtgcgctgct ggtgccaac

19

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 44

gtgcgctgct ggtgccaacc c

21

28 / 34

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 45

gtgcgttggtt ggtgttaatc c

21

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 46

gtgcgctgct ggtgtcaacc c

21

2 9 / 3 4

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 47

gtgcggtggt ggtgggaagc c

21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 48

gtgcggttggt ggtggcaacc c

21

3 0 / 3 4

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 49

gtgcgctcat ggtaccaacc c

21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 50

gtgcgctgct ggtgtcaacc c

21

3 1 / 3 4

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 51

gtgcgctgtt ggtgtcaacc c

21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 52

gtgtgttgtt ggtgtcaatc c

21

3 2 / 3 4

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 53

gtgtgttggt ggtgttaatt c

21

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 54

gtgcgttggt ggtgtttaat cc

22

3 3 / 3 4

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 55

gtgcgctgtc tgggtgctcaa ccc

23

<210> 56

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 56

gtgtcgctgt ctgggtgctca actcc

25

3 4 / 3 4

<210> 57

<211> 53

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Sequence

<400> 57

gugcguuguu gguguuaauc cgugugcugu ccggguuggc accagcagcg cac

53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12447

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/67, C12Q1/68, C12N5/00, A61K45/00, A61K48/00,
A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/67, C12Q1/68, C12N5/00, A61K45/00, A61K48/00,
A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, X	WO 02/068635 A2 (Novartis Forschungsstiftung Zweigniederlassung Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research), 06 September, 2002 (06.09.02), Page 4, Par. No. [0002]; page 7, Par. No. [0004] to page 9, Par. No. [0001]; Claims 18 to 37 (Family: none)	1-42
E, X	WO 02/066638 A1 (Gencom Corp.), 29 August, 2002 (29.08.02), Figs. 1 to 4; Claims (Family: none)	1-42

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 February, 2003 (12.02.03)

Date of mailing of the international search report
25 February, 2003 (25.02.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12447

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MIYAGISHI, M. & TAIRA, K., "U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells", NATURE BIOTECHNOLOGY, (2002 May), Vol.20, No.5, pages 497 to 500, full text	1-42
P,X	Brummelkamp, T.R. et al., "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells", SCIENCE, 19 April, 2002 (19.04.02), Vol.296, No.5567, pages 550 to 553, abstract; Figs. 1 to 3	1-42
P,X	Sui Guangchao et al., "A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 16 April, 2002 (16.04.02), Vol.99, No.8, pages 5515 to 5520, abstract; Figs. 1 to 3; table 1	1-42
P,X	Yu Jenn-Yah et al., "RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells", PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 30 April, 2002 (30.04.02), Vol.99, No.9, pages 6047 to 6052, abstract; Figs. 1 to 4	1-42
X	Wang, Z. et al., "Inhibition of Trypanosoma brucei gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters", J. BIOL. CHEM., 22 December, 2000 (22.12.00), Vol.275, No.51, pages 40174 to 40179, particularly, Fig. 1	1-9,12,13, 18-33,35-42
Y		10,11,14-17, 34
Y	OHKAWA, J. & TAIRA, K., "Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter", Hum. Gene Ther., (2000), Vol.11, pages 577 to 585, abstract; Fig. 2; discussion	10,11,14-17, 34
Y	Lewandoski, M. et al., "Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line", CURRENT BIOLOGY, (1997), Vol.7, No.2, pages 148 to 151, particularly, abstract; Figs. 1, 2	14-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/67, C12Q1/68, C12N5/00, A61K45/00, A61K48/00, A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/67, C12Q1/68, C12N5/00, A61K45/00, A61K48/00, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
EX	WO 02/068635 A2 (Novartis Forschungsstiftung Zweigniederlassung Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research), 2002.09.06, 第4頁第2段落, 第7頁第4段落 -第9頁第1段落, 特許請求の範囲18-37参照 (ファミリーなし)	1-42
EX	WO 02/066638 A1 (Gencom Corporation), 2002.08.29, 図1-4及び 特許請求の範囲参照 (ファミリーなし)	1-42

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.02.03

国際調査報告の発送日

25.02.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊

4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Miyagishi, M. & Taira, K., "U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells" NATURE BIOTECHNOLOGY, (2002 May), Vol. 20, No. 5, pp. 497-500, 全文参照	1-42
PX	Brummelkamp, T.R., et al. "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells" SCIENCE, (2002 Apr. 19), Vol. 296, No. 5567, pp. 550-553, 要約及び図1-3参照	1-42
PX	Sui Guangchao, et al., "A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, (2002 Apr. 16), Vol. 99, No. 8, pp. 5515-5520, 要約, 図1-3及び表1参照	1-42
PX	Yu Jenn-Yah et al., "RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, (2002 Apr. 30), Vol. 99, No. 9, pp. 6047-6052, 要約, 図1-4参照	1-42
X — Y	Wang, Z., et al., "Inhibition of Trypanosoma brucei gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters" J. BIOL. CHEM., (2000 Dec. 22), Vol. 275, No. 51, pp. 40174-40179, 特に図1参照	1-9, 12, 13, 18-33, 35-42 10, 11, 14-17, 34
Y	Ohkawa, J. & Taira, K., "Control of the functional activity of an antisense RNA by a tetracycline-responsive derivative of the human U6 snRNA promoter" Hum. Gene Ther., (2000), Vol. 11, pp. 577-585, 要約, 図2及びDiscussion 参照	10, 11, 14-17, 34
Y	Lewandoski, M., et al., "Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line" CURRENT BIOLOGY, (1997), Vol. 7, No. 2, pp. 148-151, 特に要約及び図1, 2参照	14-17